



Identification et caractérisation de AdcA, un membre de la famille des arrestines présent chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

Dorian Guetta

► To cite this version:

Dorian Guetta. Identification et caractérisation de AdcA, un membre de la famille des arrestines présent chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00926231

HAL Id: tel-00926231

<https://theses.hal.science/tel-00926231>

Submitted on 15 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE GRENOBLE

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE
Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Dorian GUETTA

Le 16 Septembre 2010

**Identification et caractérisation de AdcA,
un membre de la famille des arrestines présent
chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.**

Directrice de thèse :

Mme Laurence Aubry

Membres du jury :

Mme Laurence AUBRY	Examinatrice
Mr Stefan NONCHEV	Président
Mr François LETOURNEUR	Rapporteur
Mr Arnaud LABROUSSE	Rapporteur

Thèse préparée au sein
du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, iRTSV/CEA Grenoble

UMR 5092 CNRS-UJF-CEA

Ce travail de thèse a été réalisé au Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés dirigé par M. François Boulay. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant mes 3 années de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. Stefan Nonchev pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je souhaite également remercier M. François Letourneur et M. Arnaud Labrousse pour le regard critique qu'ils ont porté sur mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse.

Un immense merci également à ma directrice de thèse Laurence Aubry pour sa disponibilité, ses conseils pertinents et sa bonne humeur. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour la façon dont elle a su diriger ma thèse et sa grande patience face à mes nombreuses questions.

Un merci particulier à Gérard Klein pour tous ses précieux conseils, et sa disponibilité quotidienne lors de ces tr... quatre années de thèse. Merci également pour les nombreuses discussions que nous avons eues, scientifiques et autres.

Je remercie le laboratoire EDyP et plus particulièrement Alexandra Kraut pour le séquençage et l'analyse des nombreuses protéines que je lui ai confiées.

Je souhaite également remercier l'ensemble du laboratoire pour les différents partages, scientifiques ou non que nous avons pu avoir. Un merci particulier à Viviane et Marie-Pierre pour avoir géré mes nombreuses commandes et les démarches administratives relatives à mes dossiers de doctorant. Un grand merci également à Claire pour les milliers d'erenmeyers, d'éprouvettes et autre matériel lavés et stérilisés au cours de cette thèse.

Et une pensée également aux différents stagiaires qui sont passés par là au cours de ces 3 années ; merci pour la fraîcheur qu'ils ont apportée à l'équipe et pour leur aide lors de diverses expériences. Bonne chance et bon courage à eux pour la suite.

Il me semble également important de remercier les quelques milliards de cellules de Dictyostelium, de levures et de bactéries qui ont sacrifié leur vie pour la réalisation de cette thèse, leur rôle aura été primordial.

Enfin merci à toutes les personnes qui m'ont accompagné de près ou de loin lors de ces 3 dernières années.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	5
PARTIE I. LES ARRESTINES	7
I. Historique	7
A. Les arrestines visuelles	7
B. Les β -arrestines	7
II. Principales fonctions des β-arrestines	9
A. Régulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	9
B. Régulation d'autres types de récepteurs	20
C. Participation à la cascade de signalisation	20
III. Description	27
A. Caractéristiques générales	27
B. Données structurales	27
C. Régulation	29
IV. La superfamille des arrestines	35
A. Les protéines à domaine arrestines	35
B. Classification des arrestines	39
PARTIE II. <i>Dictyostelium discoideum</i>	41
I. <i>Dictyostelium</i>, un organisme eucaryote unicellulaire capable de multicellularité	41
A. Historique	41
B. Cycle de vie	42
II. Les atouts du modèle	43
III. Le répertoire amibien des RCPG	44
IV. <i>Dictyostelium</i>, un modèle pour l'étude du trafic endocytaire	45
A. La macropinocytose	45
B. La phagocytose	46
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	47
MATERIEL ET METHODES	49
I. Techniques de biologie cellulaire	51
A. Souches et conditions de culture cellulaire	51
B. Electroporation de <i>Dictyostelium</i>	53
C. Développement multicellulaire de <i>Dictyostelium</i>	53
D. Imagerie cellulaire	53

E. Suivi de l'activité endocytaire.....	54
II. Techniques de biologie moléculaire.....	56
A. Sous-clonage.....	56
B. Extraction de plasmides.....	58
C. Extraction d'ADN génomique de <i>Dictyostelium</i>	58
D. Southern blot.....	59
III. Techniques de biochimie.....	60
A. Analyse des protéines.....	60
B. Expression de protéines recombinantes	61
C. Pull down	63
D. Immunoprécipitation	64
E. Fractionnement subcellulaire	65
F. Filtration sur gel	65
G. Résonance plasmonique de surface.....	66
IV. Double hybride.....	67
RESULTATS	71
PARTIE I. IDENTIFICATION DES PROTEINES A DOMAINE ARRESTINE DE <i>DICTYOSTELIUM</i>.....	73
PARTIE II. CARACTERISATION DE LA PROTEINE AdcA.....	76
I. AdcA une protéine multimodulaire	76
A. Le module arrestine	77
B. Le domaine H	78
C. Le domaine ϕ	79
D. Le domaine FYVE	80
E. Le domaine Y	81
II. Des homologues d'AdcA existent chez d'autres amibes et le phytoplancton	81
III. Répartition des homologues d'AdcA chez d'autres espèces.....	83
IV. Développement d'outils pour l'étude de AdcA	84
A. Production d'anticorps anti-AdcA.....	84
B. Expression de protéines étiquetées	86
C. Expression temporelle d'AdcA	87
V. Localisation subcellulaire de la protéine AdcA	87
A. AdcA est associée à la fraction membranaire	87
B. AdcA est associée à la voie endocytaire	88
C. AdcA est recrutée sur des compartiments précoces de la voie endocytaire	90
D. La localisation endocytaire d'AdcA met en jeu le domaine FYVE de la protéine	93
VI. La protéine AdcA forme des oligomères.....	100
A. Le domaine H est capable d'homo-oligomériser de façon métal-dépendante.....	100

B. La protéine AdcA est capable de former des oligomères <i>in cellulo</i>	106
PARTIE III. ETUDE DU ROLE FONCTIONNEL DE LA PROTEINE ADCA	109
I. Obtention des mutants <i>adcA</i> et <i>adcA/adcD</i> nuls	109
A. Elaboration des constructions d'invalidation de <i>adcA</i> et <i>adcD</i>	109
B. Sélection des clones invalidés	110
II. Caractérisation phénotypique du mutant <i>adcA</i> nul	111
A. La mutation <i>adcA</i> nulle n'affecte pas la croissance cellulaire	111
B. L'invalidation de <i>adcA</i> n'a pas d'effet sur le programme de développement multicellulaire	112
C. L'activité d'endocytose n'est pas altérée dans la souche <i>adcA</i> nulle	113
D. L'invalidation de <i>adcA</i> conduit à un défaut dans la voie de recyclage depuis les endosomes	114
PARTIE IV. RECHERCHE DE PARTENAIRES DE ADCA	118
I. Approche informée	118
A. La clathrine	118
B. La machinerie ESCRT	118
II. Identification de partenaires par crible double hybride	120
A. Construction et test de l'appât	120
B. Analyse sommaire des clones positifs	121
C. Caractérisation de l'interaction AdcA-ArfA	122
III. Recherche de partenaires par pull down	127
DISCUSSION et PERSPECTIVES	131
Discussion	133
Perspectives	140
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	157
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	165
PUBLICATIONS Dorian Guetta	169

INTRODUCTION

L'introduction est structurée en 2 parties :

- Une partie « arrestines » qui pose le contexte scientifique du domaine des arrestines avec un rappel historique sur ce champ de recherche. Les arrestines elles-mêmes sont abordées du point de vue de leur mécanisme de régulation, en particulier de la signalisation des récepteurs membranaires et avec un éclairage structural qui explique leur fonctionnement.
- Une partie « modèle » qui présente le modèle biologique utilisé, l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*. Y sont rappelés les atouts du modèle et les raisons d'aborder une étude de protéines à domaine arrestine.

PARTIE I. LES ARRESTINES

I. Historique

A. Les arrestines visuelles

La première mise en évidence de l'arrestine, appelée également arrestine 1, antigène S ou protéine 48-KDa, est faite vers la fin des années 1970 dans le cas d'une maladie rétinienne chez le bœuf (Wacker *et al.*, 1977). Le groupe de Wacker montre que le dysfonctionnement de cette protéine de 48 KDa, décrite comme soluble et localisée au niveau des cellules photo-réceptrices, est à l'origine d'une maladie auto-immune touchant la rétine, l'uvéite allergique.

Les premières données fonctionnelles de l'arrestine S, obtenues en 1984 par Kuhn montrent son interaction avec la rhodopsine photo-activée et phosphorylée (Kuhn *et al.*, 1984). Cette interaction a pour effet d'empêcher la fixation de la transducine, une protéine G, au niveau de la rhodopsine et bloque par conséquent la signalisation en aval. C'est sa faculté à arrêter le signal cellulaire qui a valu le nom d'arrestine à cette protéine.

Un homologue présentant 50 % d'identité avec l'arrestine S des bâtonnets a été identifié dans les cellules photo-réceptrices de type cône et nommée arrestine 4 (ou arrestine C) (Figure 1) (Murakami *et al.*, 1993; Craft *et al.*, 1994).

B. Les β -arrestines

La désensibilisation du récepteur β_2 -adrénergique purifié et phosphorylé suite à l'ajout d'arrestine visuelle est à l'origine de l'hypothèse de la présence d'arrestines, ou de protéines ayant un rôle similaire, dans les cellules autres que photo-réceptrices (Benovic *et al.*, 1987).

En 1990, le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau bovin avec une sonde codant pour l'arrestine visuelle permet de mettre en évidence la présence d'un gène codant pour une protéine de 418 acides aminés homologue à l'arrestine visuelle (Figure 1) (Lohse *et al.*, 1990). Le nom de la β -arrestine 1, appelée aussi arrestine 2, vient de son rôle dans l'inactivation du récepteur β_2 -adrénergique.

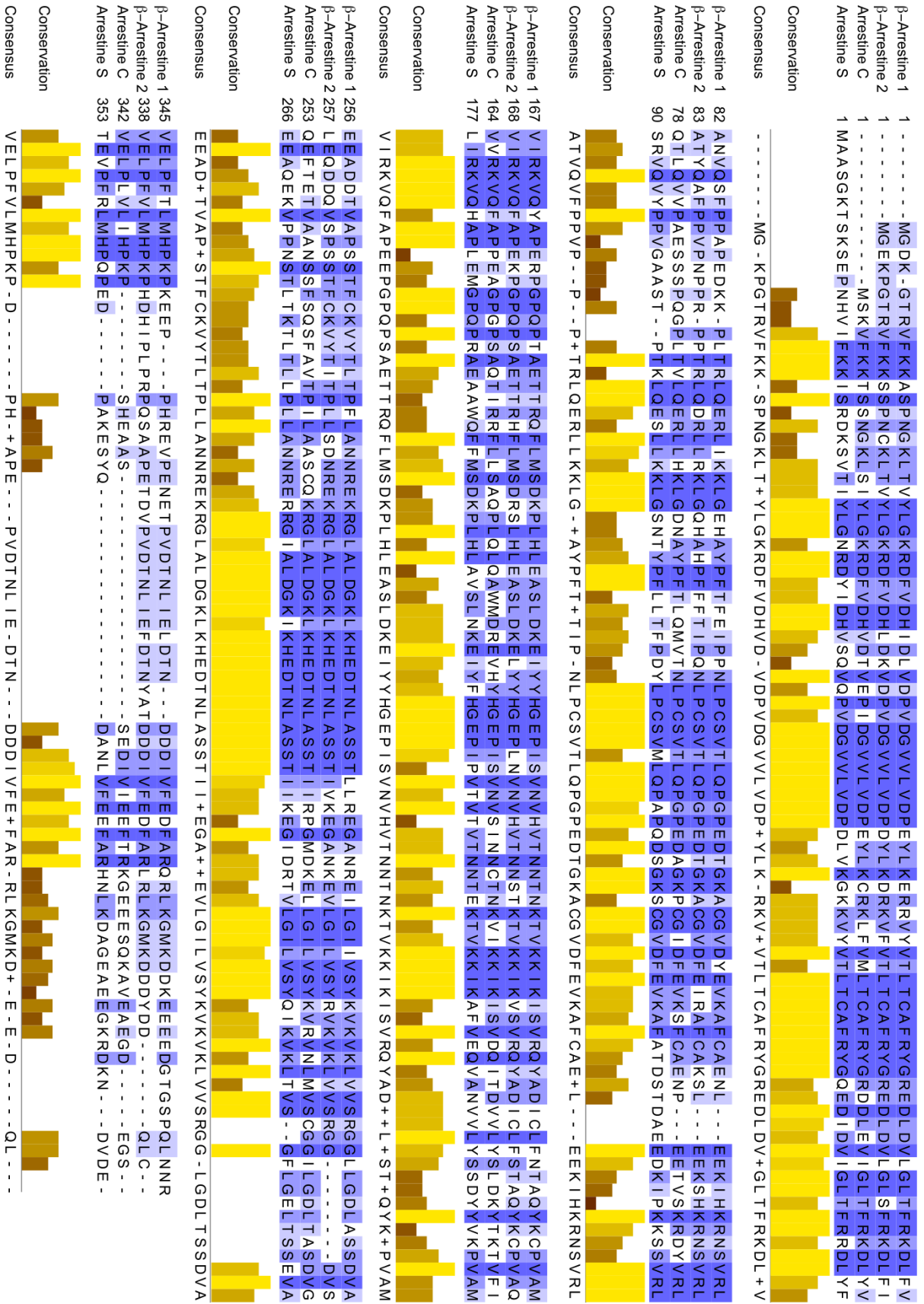


Figure 1 : Alignement des séquences des quatre arrestines et β -arrestines humaines. Les séquences des arrestines et β -arrestines humaines ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW. L'alignement ainsi généré a été enrichi et colorisé grâce au logiciel Jalview. L'intensité du bleu indique le degré de conservation entre les résidus des différentes séquences. Le degré de conservation, indiqué par des barres, va du jaune pâle (zones entièrement conservées) au brun (zones peu conservées).

Un dernier membre de la famille des arrestines a été trouvé par criblage d'une banque de thyroïde humaine. Cette protéine de 409 acides aminés a été appelée β -arrestine 2 (ou arrestine 3) du fait de sa capacité à désensibiliser le récepteur β_2 -adrénergique et sa forte homologie avec la β -arrestine 1 (Figure 1).

II. Principales fonctions des β -arrestines

Les β -arrestines, bien qu'étudiées dans un premier temps uniquement pour leur rôle dans la désensibilisation de RCPG (**R**écepteurs **C**ouplés aux **P**rotéines **G**), sont très rapidement apparues comme des protéines ayant des rôles nombreux et divers dans la cellule. Ceci est dû au répertoire important et diversifié de partenaires tels que des protéines intervenant dans la signalisation (kinases, protéines adaptatrices...), dans l'organisation et la migration cellulaire (interaction avec les trois filaments majeurs du cytosquelette : actine, tubuline et vimentine), dans l'organisation de la chromatine et la synthèse de protéines (interaction avec HDAC2, les ARN polymérases ou encore des facteurs d'élongation), des enzymes du métabolisme (la pyruvate kinase M2 par exemple), ou bien des protéines chaperones (HSP90 ou encore HSC70).

A. Régulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

1. *Les RCPG*

Les RCPG, encore appelés récepteurs à sept hélices transmembranaires ou récepteurs serpentines, représentent la plus grande famille de protéines (800 à 1000 chez l'homme) présentes chez les mammifères où ils constituent 3.4 % du génome (Bockaert and Pin, 1999).

Ces récepteurs qui présentent sept piliers transmembranaires, tous organisés en hélices α , peuvent interagir avec des protéines G hétérotrimériques après leur activation, suite à la liaison d'un agoniste qui va entraîner une modification structurale de leur extrémité C-terminale cytoplasmique. C'est cette interaction qui leur vaut le nom de RCPG. Une fois que la protéine G est couplée au récepteur, le GDP de la sous-unité $G\alpha$ est échangé contre un GTP

par un facteur d'échange GEF (**G**uanine nucleotide **E**xchange **F**actor). La protéine G passe à l'état actif et se dissocie en ses sous-unités, d'un côté la sous-unité $G\alpha$ couplée au GTP et de l'autre le complexe $G\beta\gamma$, chaque entité pouvant activer une cascade de signalisation (Figure 2). Le récepteur est par la suite plus ou moins rapidement désensibilisé par l'arrestine qui se fixe sur son extrémité C-terminale phosphorylée par des kinases spécifiques de type GRK et empêche une nouvelle interaction entre le récepteur et les protéines G hétérotrimériques.

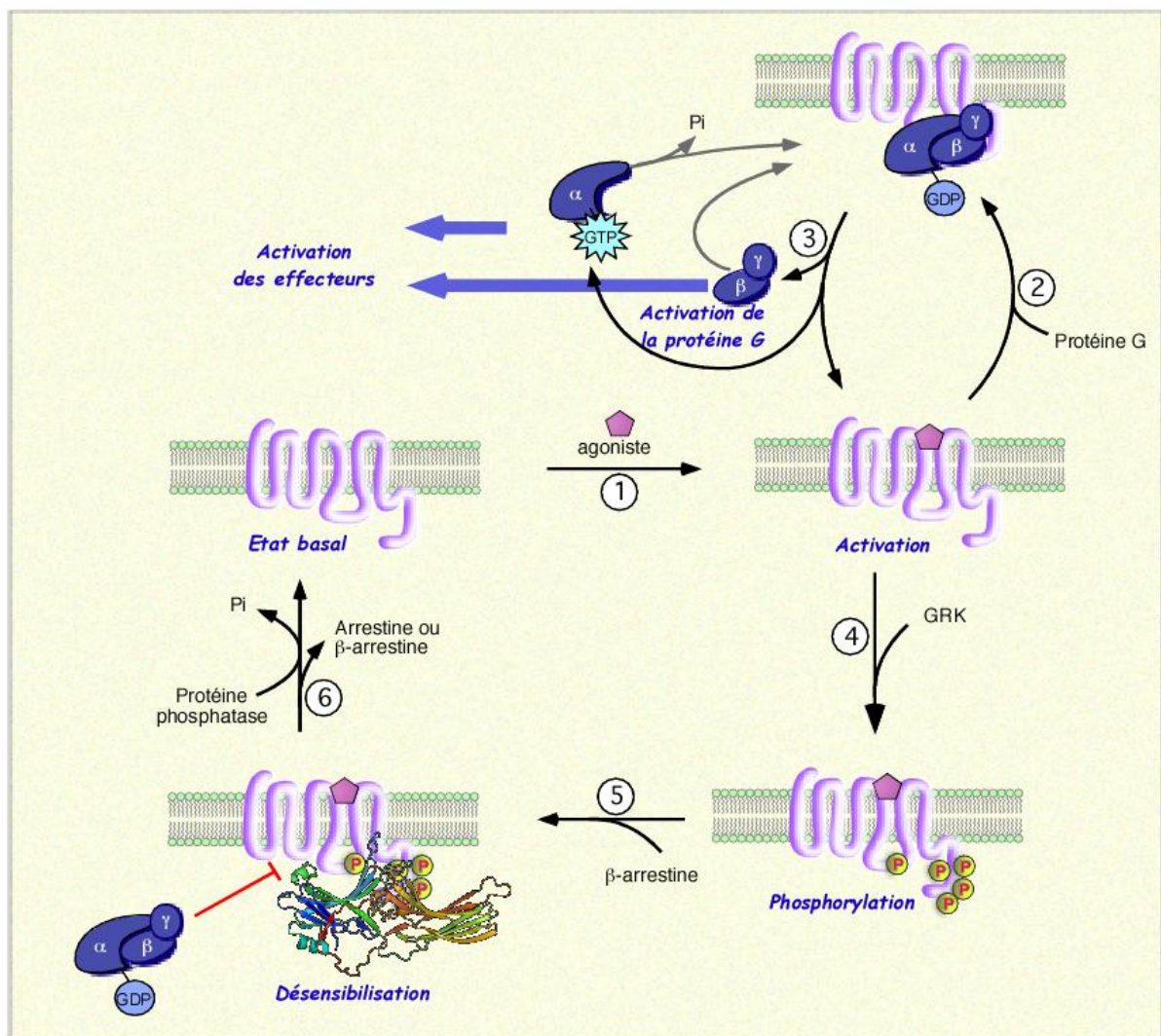


Figure 2 : Schéma des voies d'activation et de désensibilisation d'un récepteur couplé aux protéines G

L'interaction d'un récepteur avec l'arrestine va permettre de plus le recrutement de la machinerie d'endocytose (adaptines, clathrine) qui va entraîner l'enrichissement du récepteur au niveau de puits recouverts de clathrine. Une fois internalisé sur un endosome, le récepteur

va être soit recyclé vers la membrane plasmique après déphosphorylation de sa queue C-terminale par une phosphatase et le découplage du ligand et de l'arrestine, soit dégradé par le lysosome (Figure 3) (Tan *et al.*, 2004). Le nombre important des récepteurs de type RCPG, leur diversité et le fait qu'ils soient la principale cible des drogues pharmaceutiques rend essentielle la compréhension de leur régulation et de leur rôle dans les cascades de signalisation.

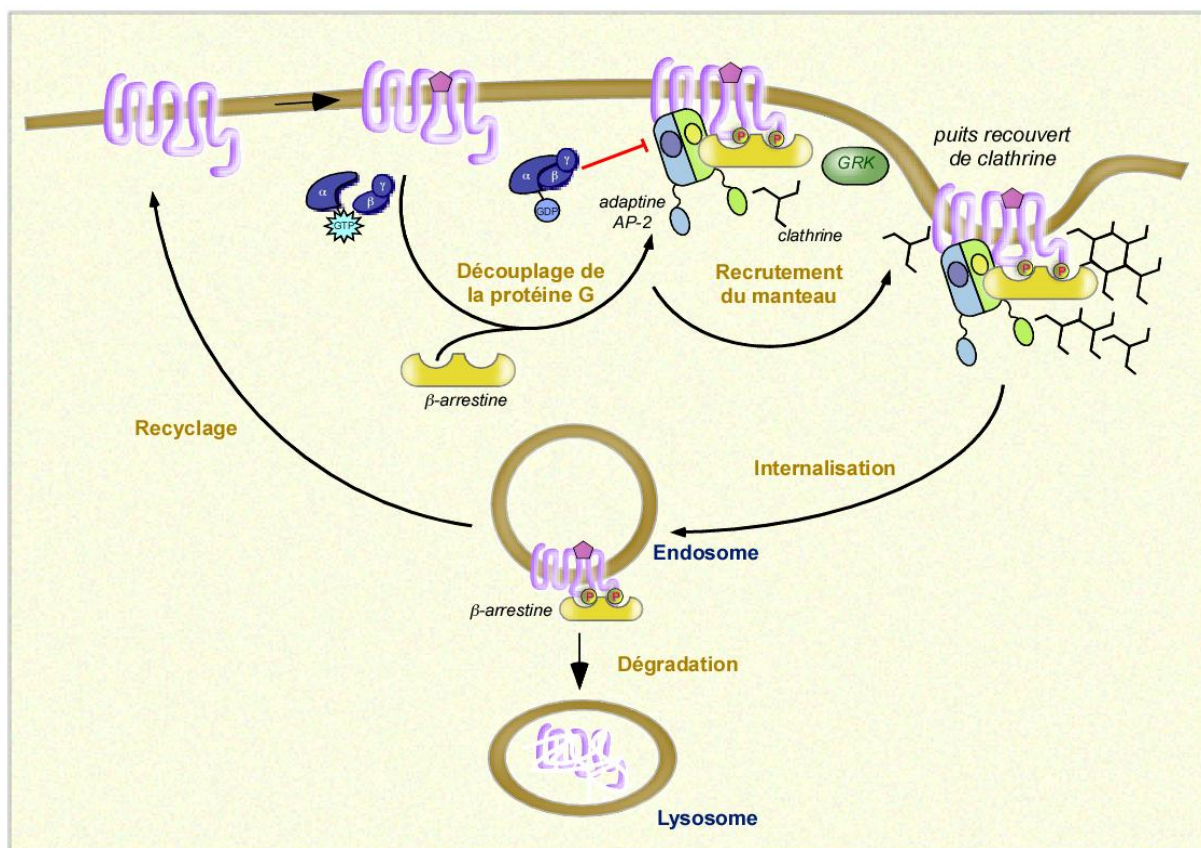


Figure 3 : Représentation schématique du cycle des RCPG. Après activation par l'agoniste, le RCPG est désensibilisé suite à la liaison de l'arrestine, c'est-à-dire qu'il n'est plus capable d'interagir avec les protéines G hétérotrimériques. Il est ensuite enrichi au niveau de puits recouverts de clathrine pour être internalisé. Une fois sur un endosome de tri, le récepteur va soit être trié dans une voie de dégradation (lysosome), soit être recyclé au niveau de la membrane plasmique où il pourra entamer un nouveau cycle d'activation.

2. Interaction des RCPG avec les arrestines

Les RCPG sont classés en deux catégories : les récepteurs de catégorie A (récepteur β -adrénergique, récepteur μ aux opioïdes, récepteur de dopamine, par exemple) qui sont recyclés rapidement à la membrane plasmique, et les récepteurs de classe B (récepteur de l'angiotensine II type 1A, récepteur de neurotensine ou encore le récepteur de vasopressine

entre autres) qui sont eux, soit recyclés de façon très lente, soit envoyés dans une voie de dégradation (Oakley *et al.*, 2000).

Les β -arrestines sont capables d'interagir avec l'ensemble des RCPG, mais la stabilité de cette interaction est différente selon la classe du récepteur. L'affinité vis-à-vis des récepteurs de classe A, bien que faible, est meilleure pour la β -arrestine 2 que pour la β -arrestine 1 et nécessite l'ubiquitination transitoire de l'arrestine (le temps de l'interaction avec le récepteur qui a lieu au niveau de la membrane plasmique) (Shenoy and Lefkowitz, 2003). En revanche, l'interaction des récepteurs de classe B avec les β -arrestines 1 et 2 est stable et met en jeu des groupe d'acides aminés serine/thréonine présents sur l'extrémité C-terminale du récepteur (Oakley *et al.*, 2001). La stabilité de l'interaction est due à l'état d'ubiquitination du récepteur mais est également régulée par son état de phosphorylation (Shenoy *et al.*, 2006). Le complexe récepteur-arrestine reste présent sur les endosomes après son internalisation et les récepteurs seront recyclés ou dégradés.

L'interaction entre l'arrestine et le récepteur implique l'engagement au niveau de l'arrestine d'un site capable de discriminer entre les formes actives, inactives et les différents états de phosphorylation du récepteur (Gurevich and Benovic, 1995). Des données obtenues avec la β -arrestine 1 montrent que la formation d'un complexe entre cette arrestine et un récepteur qui n'est ni phosphorylé ni activé est impossible. La formation d'un tel complexe est un événement rare, mais observable lorsque le récepteur est seulement phosphorylé ou activé. Si le récepteur est à la fois phosphorylé et activé, la fréquence d'interaction entre le récepteur et la β -arrestine 1 est alors augmentée d'environ quarante fois. Ceci démontre la présence sur l'arrestine d'un site de reconnaissance du récepteur activé et d'un site qui reconnaît l'état de phosphorylation, les deux ayant chacun une affinité relativement faible (Gurevich and Gurevich, 2004). L'interaction avec le récepteur entraîne une réorganisation globale de la molécule d'arrestine qui va alors voir son affinité pour le récepteur augmenter fortement (Gurevich and Gurevich, 2004). D'après la localisation des sites d'interaction de l'arrestine pour le récepteur, il est probable que les deux domaines de l'arrestine bougent l'un par rapport à l'autre, grâce à la boucle de connexion qui relie les domaines N et C, afin que tous les sites puissent être en contact simultanément. Quatre domaines de l'arrestine semblent en particulier essentiels à ce changement de conformation : le cœur polaire, l'extrémité C-terminale, le feuillet $\beta 1$ et l'hélice $\alpha 1$ (Gurevich and Gurevich, 2004). Il y a de fortes

contraintes qui maintiennent l'arrestine dans sa conformation inactive, et cela est nécessaire pour qu'elle garde sa sélectivité envers les récepteurs activés et phosphorylés. Chez la β -arrestine 1 dans sa conformation basale, le résidu Arg175 interagit avec un partenaire intramoléculaire chargé négativement. Les lysines 14 et 15 du domaine N sont les premiers résidus à entrer en contact avec les phosphates du récepteur et servent en quelque sorte de guide pour conduire le récepteur phosphorylé au niveau du site de reconnaissance sur l'arrestine, ce qui a pour conséquence de neutraliser l'arginine 175 (Vishnivetskiy *et al.*, 2000). Cette modification de charge relâche les contraintes imposées par le cœur polaire sur l'extrémité C-terminale de l'arrestine qui est libérée et devient accessible pour ses partenaires (Gurevich and Gurevich, 2006) (Figure 4). D'après la structure cristallographique de l'arrestine, le senseur de phosphate serait composé de cinq résidus chargés qui forment le cœur polaire (Cf page 27, III-B : Données structurales) à l'interface des domaines N et C de l'arrestine : Asp30, Arg175, Asp296, Asp303 et Arg382 (figure 4) (Gurevich and Gurevich, 2004).

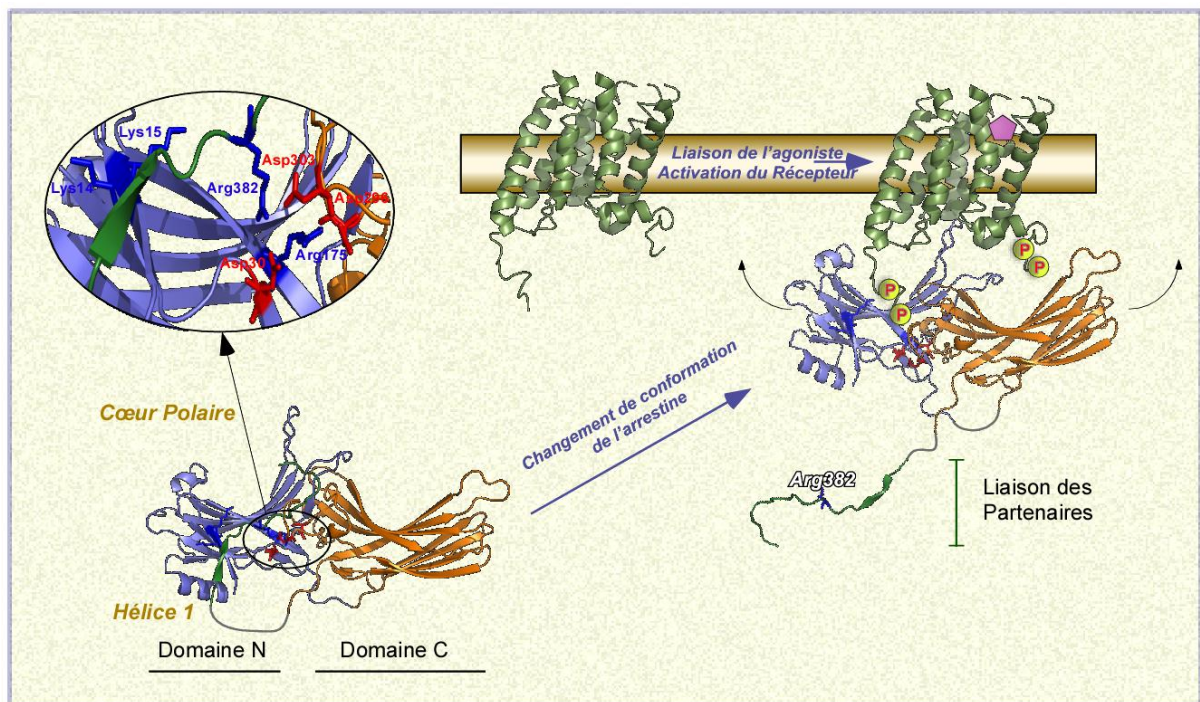


Figure 4 : Activation de l'arrestine par interaction avec un RCPG. L'arrestine possède un cœur polaire capable d'interagir avec un RCPG activé. Cette interaction va déstabiliser le cœur polaire, induire un changement de conformation de l'arrestine, l'incurvation des deux domaines pour permettre le contact avec le récepteur et libérer son extrémité C-terminale qui pourra recruter des partenaires.

De petits peptides synthétiques correspondant à des domaines particuliers de la rhodopsine, le récepteur de la lumière, ont été testés vis-à-vis de l'arrestine et différents effets ont été observés. Si le peptide synthétisé correspond à la forme phosphorylée de l'extrémité C-terminale de la rhodopsine, il y a activation de l'arrestine qui peut alors se lier sur une rhodopsine non phosphorylée. Si le peptide correspond à une forme non phosphorylable de l'extrémité C-terminale, aucun effet n'est observé (McDowell *et al.*, 2001). La conformation prise par l'arrestine après son interaction initiale avec le récepteur va déterminer quels sites d'interaction de la protéine vont être exposés et donc avec quels partenaires elle va pouvoir interagir (Gurevich and Gurevich, 2004).

Sur leur extrémité C-terminale, ou sur leur 3^{ème} boucle cytoplasmique, les RCPG possèdent entre 15 et 20 sites qui sont phosphorylés aléatoirement par une GRK (**G** Protein coupled **R**eceptor **K**inase). Il en résulte une grande variété de profils de phosphorylation qui n'influencent pas l'interaction avec les arrestines, car seul le nombre de sites phosphorylés est pris en compte. Si un seul site est phosphorylé, aucune interaction entre le récepteur et les β -arrestines n'est observée. L'interaction commence à se faire à partir de deux sites phosphorylés et l'affinité n'est plus améliorée au-delà de trois sites phosphorylés (Gurevich and Gurevich, 2004). Ces différents patrons peuvent toutefois servir de code définissant la structure active de l'arrestine (voir page 29, III-C-1 : Activation).

3. Rôle des β -arrestines dans la désensibilisation des récepteurs

La liaison d'une arrestine sur un RCPG activé et phosphorylé entraîne l'arrêt du signal en empêchant une nouvelle interaction du récepteur avec les protéines G hétérotrimériques (voir Figure 3). Ce rôle est le premier à avoir été mis en évidence pour les arrestines (Kuhn *et al.*, 1984).

On note une forte homologie entre des domaines spécifiques des arrestines (visuelles ou non) et le domaine C-terminal de certaines protéines G impliquées dans le couplage aux récepteurs. Il y a par exemple une forte homologie de séquence entre le fragment 373-393 de l'arrestine S et les résidus C terminaux de la transducine α_1 (Figure 5A) et entre les sites 379-388 de la β -arrestine 1 ou 377-389 de la β -arrestine 2 avec un fragment de la sous-unité $G\alpha$

impliqué dans le couplage avec le récepteur (Figure 5B) (Wistow *et al.*, 1986) (Lohse *et al.*, 1990).

A	transducine α_1	325	QNVKFVFD	DAVTDII	IKENL	KDCGLF
	arrestine S	373	QDANLVFEE	----	FARHNL	KDAGEA
B	β -arrestine 1	291	GK	LKHED		
	β -arrestine 2	293	GQ	LKHED		
	$G\alpha_s$	304	GK	SKIED		
	$G\alpha_{i2}$					
					379	LDTN---
						DDDIVF
					377	FDTNYAT
						DDDDIVF
					367	VDTE---
						NIRRVF
					327	TDTK---
						NVQFVF

Figure 5 : Homologie de séquence entre les arrestines et les protéines G hétérotrimériques (Modifié de la thèse d'Emilie Huet UJF 2007). **A.** Alignement des séquences d'acides aminés de la transducine α_1 et de l'arrestine S. **B.** Alignement des séquences protéiques des β -arrestines 1 et 2 avec les sous unités $G\alpha_s$ et $G\alpha_{i2}$.

Les arrestines pourraient donc prendre la place des protéines $G\alpha$ et masquer complètement leur site d'interaction avec le récepteur. Lorsque le récepteur est phosphorylé, son affinité pour les arrestines augmente alors qu'elle diminue pour les protéines G hétérotrimériques (Gibson *et al.*, 2000). Ceci est observé notamment pour la rhodopsine qui est phosphorylée sur son extrémité C-terminale après activation par la lumière, phosphorylation qui entraîne son interaction avec l'arrestine. Le résultat de cette interaction qui empêche l'interaction de la transducine avec la rhodopsine est l'arrêt de la signalisation dans les cellules photo-réceptrices (Skegro *et al.*, 2007). En plus de la phosphorylation, le domaine DRY, conservé chez les RCPG et impliqué dans l'activation des protéines G, est nécessaire au couplage de l'arrestine avec le récepteur activé et phosphorylé. Ceci a été montré pour le récepteur FPR (**F**ormyl **P**eptide **R**eceptor) chez qui la mutation du domaine DRY (R123G) entraîne une perte d'interaction avec les β -arrestines sans toutefois empêcher sa phosphorylation (Bennett *et al.*, 2000).

Parfois, l'affinité des β -arrestines pour un récepteur peut varier selon l'agoniste par lequel le récepteur est activé comme dans le cas du récepteur AT1R (Angiotensin II type I receptor). Lorsque ce récepteur est activé par l'angiotensine II, il est internalisé via les arrestines après avoir enclenché une double voie de signalisation via les protéines G d'une part et via les arrestines d'autre part. Par contre si ce même récepteur est activé par un ligand synthétique

issu de la modification de l'angiotensine (SII-Angiotensine II = Sarcosine, Isoleucine, Isoleucine-Angiotensine II), la voie de signalisation en aval des protéines G n'est pas activée alors que la voie de signalisation via les β -arrestines est conservée (Violin and Lefkowitz, 2007). Un autre exemple est celui du récepteur μ aux opioïdes qui est internalisé suite à son activation par l'enképhaline (neurotransmetteur entrant en jeu dans l'inhibition de la douleur), mais qui ne l'est pas si l'agoniste est la morphine. Il a pu être montré que la morphine entraîne une faible phosphorylation du récepteur, moins efficace pour le recrutement des arrestines, et par conséquent une interaction prolongée du récepteur avec les protéines G hétérotrimériques et donc une signalisation plus importante (Violin and Lefkowitz, 2007). Ceci étant, l'observation d'une stimulation par la morphine plus intense et plus longue chez des souris KO pour une des β -arrestines montre qu'il y a quand même une régulation du récepteur par les arrestines dans le cas d'une activation par la morphine (Bohn *et al.*, 1999).

Le recrutement de l'arrestine au niveau du récepteur et l'internalisation de celui-ci ne sont pas liés à l'activation de la voie de signalisation via les protéines G hétérotrimériques. En effet dans le système cellulaire S49 cys⁻, qui n'exprime pas la sous-unité G α 5 et ne propage donc pas la signalisation via l'AMP cyclique, la β -arrestine 2 est toujours recrutée au niveau du récepteur activé par son agoniste et le récepteur est internalisé (Barak *et al.*, 2006).

Les arrestines interviennent aussi à un autre niveau dans la régulation du signal en participant à la diminution du niveau de certains messagers secondaires tel que l'AMP cyclique ou le diacylglycérol (DAG) en recrutant directement la phosphodiesterase ou la diacylglycerol kinase (DGK) à proximité du récepteur (Barki-Harrington and Rockman, 2008).

4. Internalisation des RCPG par les arrestines

En plus de stopper la cascade de signalisation en empêchant l'interaction du récepteur activé avec les protéines G hétérotrimériques, les β -arrestines régulent également la signalisation via les RCPG en les internalisant et les séquestrant sur des endosomes plus ou moins longtemps (Ferguson *et al.*, 1996). Lors de cette internalisation, les arrestines ont un rôle de protéines adaptatrices pour cibler les puits recouverts de clathrine grâce à des sites

d'interaction avec la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine (Figure 6). Le site d'interaction avec la clathrine se situe sur le domaine C des β -arrestines (motif consensus d'interaction avec la clathrine : L[L,I][D,H,E][L,F][D,E] ; séquence LIELD sur la β -arrestine 1 et LIEFD sur la β -arrestine 2). Son domaine d'interaction avec la protéine AP-2 met en jeu les arginines 393 et 395 pour la β -arrestine 1 et 394 et 396 pour la β -arrestine 2 (Laporte *et al.*, 2000). C'est cette interaction avec l'AP-2 qui est essentielle pour le ciblage du complexe arrestine-récepteur au niveau des puits recouverts de clathrine (Laporte *et al.*, 2000).

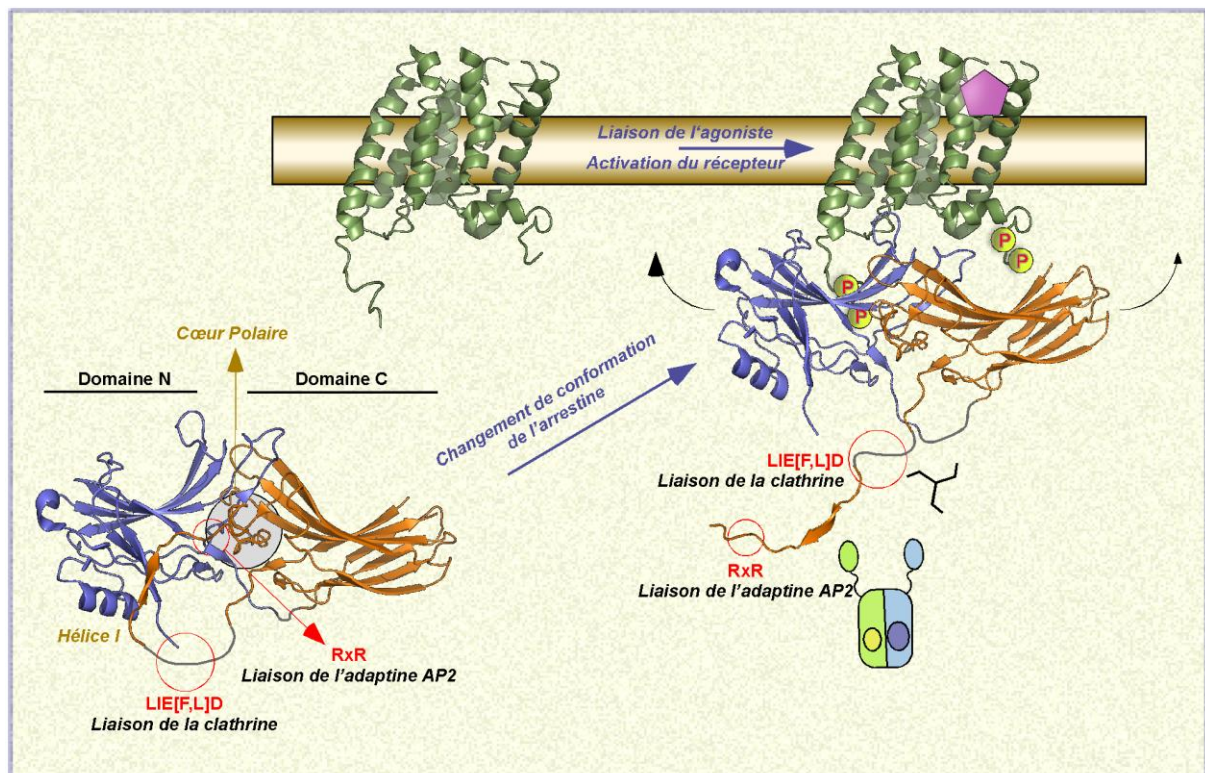


Figure 6 : L'activation de l'arrestine par interaction avec un RCPG permet le recrutement de la machinerie d'endocytose. L'activation de l'arrestine par interaction avec un RCPG relâche la queue C-terminale et démasque les sites de liaison de l'adaptine AP-2 et de la clathrine.

Les arrestines interagissent également avec des partenaires non présents au niveau des puits recouverts de clathrine mais participant à l'internalisation, tel que Arf6 (ADP-ribosylation factor 6), une petite protéine G qui interagit avec le domaine C-terminal de la β -arrestine 2 et sa protéine GEF (Guanine Exchange Factor), ARNO (ARF Nucleotide binding site Opener), avec laquelle la β -arrestine 2 interagit de façon constitutive (Claing *et al.*, 2001). Arf6 est une protéine connue pour participer à différents mécanismes faisant entrer en jeu la

dynamique du cytosquelette tels que l'endocytose, la phagocytose ou le trafic cellulaire (Donaldson, 2003) (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Arf6 est également connu pour participer à l'internalisation (et donc la régulation) des RCPG (Premont *et al.*, 1998).

Les β -arrestines possèdent aussi un site d'interaction avec des phosphoinositides au niveau d'un domaine présent sur le domaine C constitué de trois acides aminés : Lys 233, Arg237 et Lys 251 (interaction démontrée pour la β -arrestine 2 uniquement mais ces acides aminés sont conservés chez la β -arrestine 1) (Milano *et al.*, 2006). La mutation de ces acides aminés (KRK/Q) entraîne un défaut de l'adressage des récepteurs au niveau des puits recouverts de clathrine et par conséquent une forte diminution de leur internalisation alors que les β -arrestines ne perdent leur capacité ni de liaison à la clathrine ni d'interaction avec les récepteurs (Gaidarov *et al.*, 1999). Les β -arrestines ont une bonne affinité pour les phosphoinositides phosphates (PIP) PIP₃ et PIP₂ (respectivement 0.3 μ M et 1.4 μ M) qui sont de bons candidats comme ligands pour les arrestines au niveau de la membrane plasmique. On note également une très forte affinité des β -arrestines avec le phosphoinositide soluble IP₆ (0.08 μ M) qui est abondant dans les cellules (entre 15 et 100 μ M) et qui favorise fortement l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des arrestines (Gaidarov *et al.*, 1999) (Pour rôle dans la régulation voir page 32, III-C-4 : Oligomérisation).

5. Rôle des arrestines dans la régulation du recyclage et de la dégradation de RCPG

Le devenir du RCPG, à savoir son recyclage ou sa dégradation après son activation par un agoniste, dépend de son extrémité C-terminale ainsi que des partenaires auxquels il est associé.

Les récepteurs recyclés présentent en commun un motif d'interaction protéine-protéine, PDZ. La mutation de ce motif, présent entre autres chez le récepteur β 2 adrénergique, empêche le recyclage du récepteur. A l'inverse, l'ajout de ce motif sur un récepteur normalement recyclé lentement ou dégradé permet un recyclage plus rapide. Ce motif semble donc avoir un rôle indispensable pour le recyclage des récepteurs (Gage *et al.*, 2001) (Paasche *et al.*, 2005).

L'interaction entre le récepteur et une arrestine fonctionnelle est nécessaire pour le recyclage. Ce point a été démontré par le fait que l'inhibition de la transcription des arrestines par un ARN anti-sens entraîne un défaut significatif du recyclage des RCPG (Mundell *et al.*, 2000). Cependant, bien que nécessaire, cette interaction entre le récepteur et l'arrestine ne doit pas être trop forte. Si les deux protagonistes ne peuvent pas être dissociés, le récepteur ne peut pas être recyclé et il est dégradé (Simaan *et al.*, 2005).

L'implication ou non de l'arrestine dans le recyclage des récepteurs reflète plutôt bien leur répartition entre les classes A et B. Les récepteurs de classe A ont une interaction transitoire avec l'arrestine et sont recyclés rapidement, alors que les récepteurs de classe B ont une interaction plus stable et sont recyclés plus lentement ou sont dégradés s'ils restent sur les endosomes.

Un autre aspect intéressant dans la régulation est la possibilité pour les RCPG de former des hétéro-oligomères qui vont influencer différemment leur interaction avec les arrestines et leur propre devenir. Les données obtenues sur le comportement de tels dimères avec les récepteurs adrénergiques $\alpha 1a$ et $\alpha 1b$ indiquent que l'activation d'un seul des deux récepteurs est suffisante pour l'internalisation du complexe par les β -arrestines (Jordan *et al.*, 2001). Des études sur les récepteurs à la vasopressine V1a et V2 ont permis de visualiser le comportement du complexe après son internalisation. Le récepteur V1a est normalement recyclé très rapidement vers la membrane plasmique après son activation par l'agoniste alors que le récepteur V2 se dissocie beaucoup plus lentement de la β -arrestine et est accumulé au niveau des endosomes. Lorsque ces 2 récepteurs forment un hétéro-dimère stable, ils restent associés lors de l'internalisation par la β -arrestine. Le devenir du complexe va être différent selon l'agoniste qui aura activé le dimère de récepteurs. Si l'activation se fait par un agoniste non sélectif, l'hétéro-dimère suit la même voie que le récepteur V2 seul. Si l'activation se fait par un agoniste spécifique du récepteur V1a, on observe un recyclage du dimère vers la membrane plasmique (Maggio *et al.*, 2005).

L'hétéro-oligomérisation de récepteurs peut interférer avec la voie de signalisation MAP kinase déclenchée par les β -arrestines. Dans l'exemple d'un hétéro-dimère constitué des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques, la phosphorylation de ERK 1/2 normalement médiée par l'arrestine après activation du récepteur $\beta 2$ adrénergique n'a pas lieu. L'oligomérisation de

ces deux récepteurs inhibe donc l'activation de la voie MAP kinase ERK 1/2 (Lavoie *et al.*, 2002).

B. Régulation d'autres types de récepteurs

Le développement de *Drosophila melanogaster* est un processus dans lequel différents types de récepteurs sont régulés par les β -arrestines. A côté de Frizzled 4 (Fz4), un récepteur du type RCPG qui interagit avec la β -arrestine 2 via la protéine Dishevelled (Dsh) (Chen *et al.*, 2003b), le récepteur Notch à un seul passage transmembranaire est également régulé par les β -arrestines (Mukherjee *et al.*, 2005). Les β -arrestines sont également impliquées dans l'internalisation de récepteurs à des facteurs de croissance tel que le récepteur à l'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) ou le facteur TGF- β (Transforming Growth Factor type III) (Lin *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2003a). De plus, l'arrestine participe à la régulation du récepteur à l'IGF en augmentant son niveau d'ubiquitination et déclenche ainsi sa dégradation (Girnita *et al.*, 2005).

Les β -arrestines régulent également des canaux échangeurs d'ions tel que NHE5 qui est un échangeur neuronal Na^+/H^+ . Il a pu être montré par une analyse double hybride ainsi que par des expériences de pull down que l'extrémité C-terminale cytoplasmique de cet échangeur est capable d'interagir directement avec le domaine C des β -arrestines 1 et 2. A la suite de cette interaction, le complexe NHE- β -arrestine se comporte de la même façon qu'un récepteur de classe B à la condition que NHE5 soit phosphorylé (Szabo *et al.*, 2005).

C. Participation à la cascade de signalisation

1. Généralités sur les voies de signalisation

Les voies de signalisation mettent en jeu des cascades d'événements très régulées à l'aide d'échafaudages protéiques permettant un contrôle de ces événements de façon spatio-temporelle (Pawson and Scott, 1997). La participation des β -arrestines à ces échafaudages protéiques est démontrée (Figure 7), notamment au niveau de la voie des MAP kinases (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

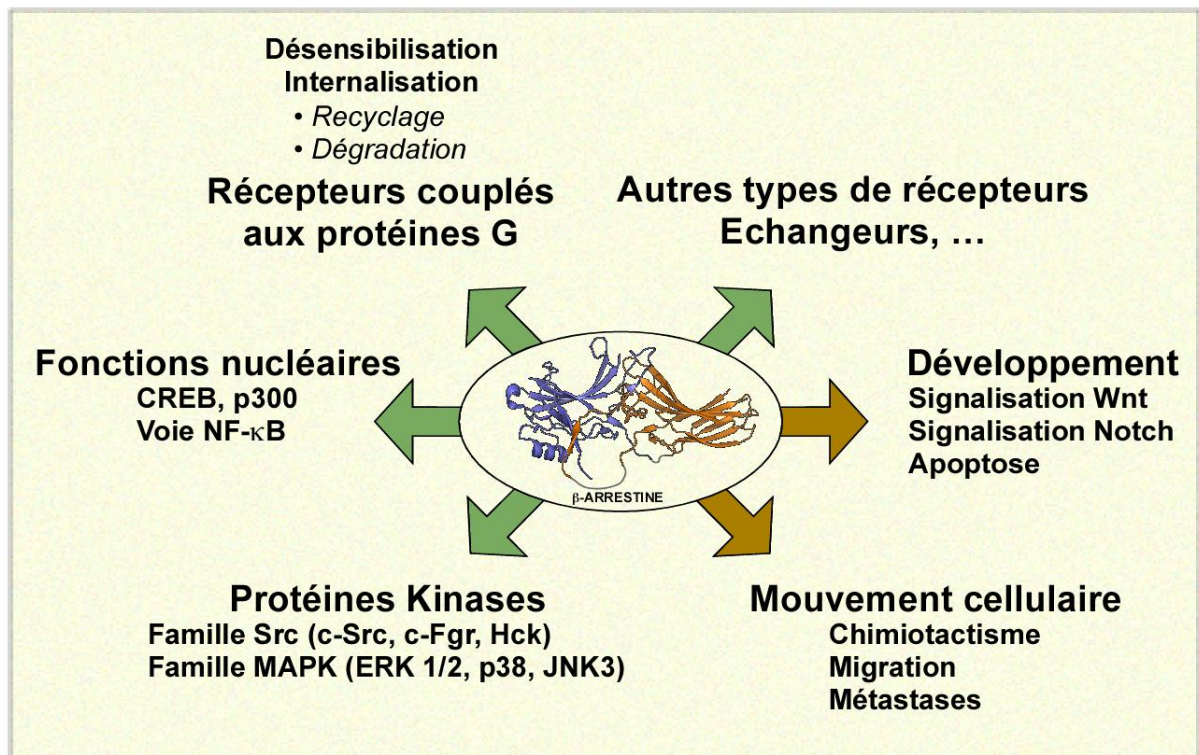


Figure 7 : Résumé des voies de signalisation régulées par les arrestines

2. Voie MAP kinase

Il a été établi à la fin des années 1990 que les β -arrestines sont capables de recruter la tyrosine kinase c-Src au niveau de récepteurs activés (Luttrell *et al.*, 1999), ce qui active la cascade des MAP kinases (Figure 8). Mais la formation de complexes bien plus importants peut avoir lieu autour des β -arrestines recrutées à la membrane plasmique par les fortes concentrations en PIP2 et PIP3. Par exemple, l'activation du récepteur PAR2 conduit à l'oligomérisation de la β -arrestine 1 avec le récepteur activé, la kinase Raf-1 et les kinases ERK1/2 phosphorylées (DeFea *et al.*, 2000). De même, l'activation du récepteur AT₁AR entraîne la formation d'un complexe contenant la β -arrestine 2, le récepteur activé, Raf-1, MEK1 (une MAP kinase kinase) et ERK1/2 phosphorylées (Luttrell *et al.*, 2001). La stabilité du complexe récepteur- β -arrestine-MAP kinase, et donc l'activation de la voie MAP kinase, dépend de l'ubiquitination d'un résidu lysine spécifique sur les β -arrestines (Shenoy and

Lefkowitz, 2005b). Dans le cas du récepteur AT1aR (Angiotensin II Type **1a** Receptor), la surexpression des β -arrestines inhibe la signalisation G protéine-dépendante tout en favorisant la signalisation dépendant des β -arrestines (Tohgo *et al.*, 2002). Notons aussi que l'association forcée de la β -arrestine 2 avec le récepteur à la vasopressine induit l'internalisation du récepteur et l'activation de la voie MAP kinase en absence d'agoniste et donc de phosphorylation du récepteur. La localisation des β -arrestines au niveau de la membrane plasmique est suffisante pour activer la voie de signalisation MAP-kinase, et l'activation ou la phosphorylation du récepteur n'est pas nécessaire (Terrillon and Bouvier, 2004).

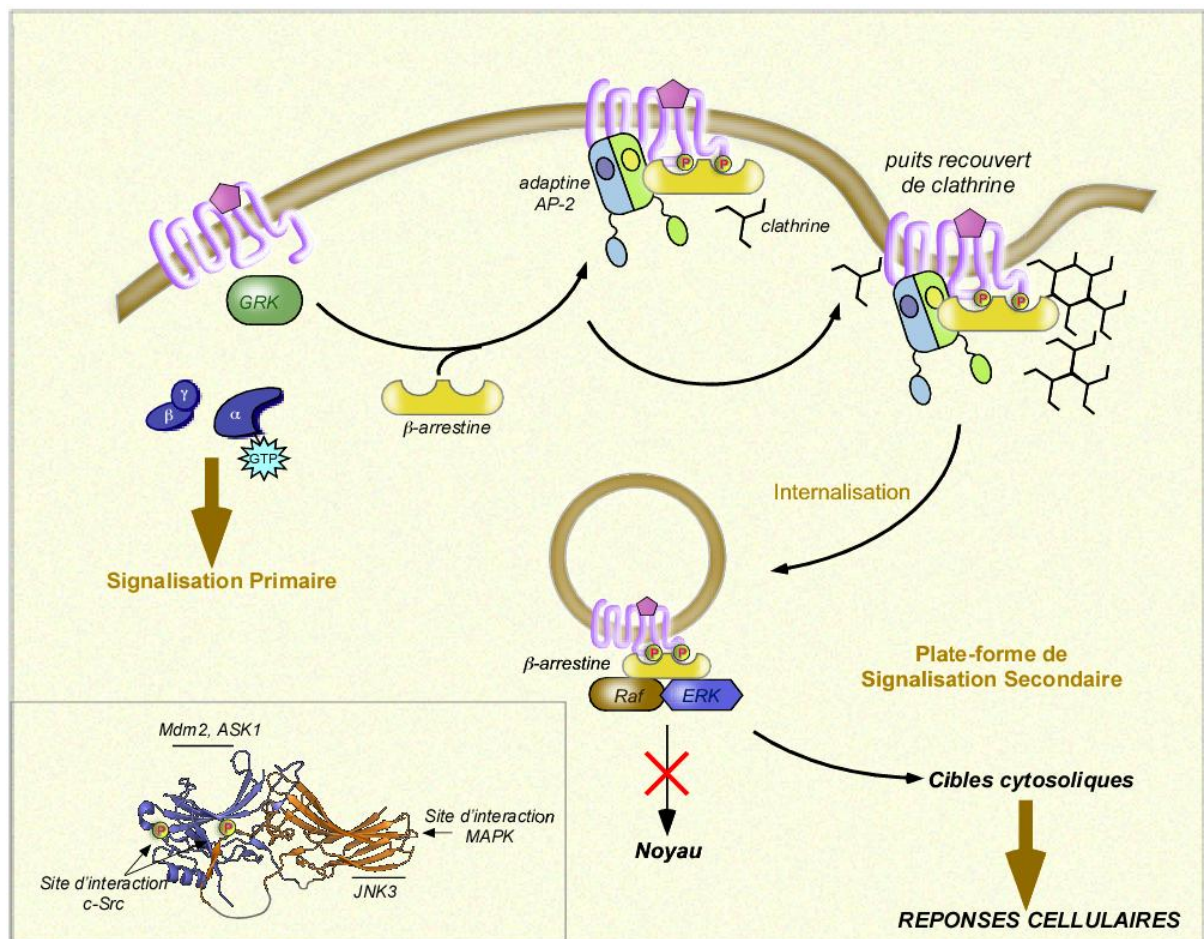


Figure 8 : L'arrestine sert de plate-forme secondaire de signalisation. Les β -arrestines possèdent des sites de liaison des MAP kinases, et des kinases c-Src et JNK3. Cette liaison qui se fait au niveau de l'endosome empêche la translocation des kinases au noyau et permet la phosphorylation de nouvelles cibles cytosoliques et l'activation de réponses cellulaires.

La diminution du niveau d'expression de la β -arrestine 2 par un ARN antisens permet de démontrer, après activation du récepteur à l'angiotensine de type II, l'existence de deux voies de signalisation. La première, dépendant des protéines G, va entraîner une activation rapide et transitoire des ERK1/2 qui vont migrer au niveau du noyau où elles vont phosphoryler des facteurs de transcription. Une autre dépendant de la β -arrestine 2, plus lente et persistant dans le temps, va entraîner la phosphorylation de protéines dans le cytosol (Ahn *et al.*, 2004). Des observations identiques ont été faites pour le récepteur de l'hormone FSH dont l'activation entraîne deux voies de signalisation, la première mettant en jeu une sous-unité de type $G\alpha$ et la PKA et la seconde les β -arrestines (Kara *et al.*, 2006).

De part leur implication dans l'activation d'une seconde voie de signalisation, les β -arrestines interviennent dans la régulation d'un certain nombre de réponses cellulaires telles que le chimiotactisme en participant par exemple à la réorganisation du cytosquelette via les ERK après activation du récepteur PAR2 (Ge *et al.*, 2003), ou encore à la polarisation cellulaire en activant p38 (une MAP kinase) après activation du récepteur PAF (McLaughlin *et al.*, 2006). Cette implication dans le chimiotactisme est confirmée *in vivo* par la perte de migration et une accumulation des lymphocytes T au niveau de la voie respiratoire chez des souris invalidées pour le gène de la β -arrestine 2 (Walker *et al.*, 2003). L'implication de la β -arrestine 2 dans le chimiotactisme ne s'arrête pas là. Elle joue un rôle important dans la motilité induite par l'activation du récepteur CXCR2 (Sun *et al.*, 2002) (Walker *et al.*, 2003). En effet, après activation du récepteur CXCR2 par son agoniste, le facteur 1α , une voie p38 MAP kinase est activée. Lorsque la β -arrestine 2 est surexprimée dans les cellules, une nette augmentation de la motilité cellulaire est alors observée après activation du récepteur en comparaison aux cellules sauvages, et inversement lorsque l'expression de la β -arrestine 2 est inhibée. Le même effet d'augmentation du chimiotactisme est observé avec l'activation du récepteur CCR5 mais pas lors de celle du récepteur à l'EGF, ce qui montre bien une spécificité de réponse de la β -arrestine selon le récepteur par lequel elle est recrutée.

Ces résultats, associés à ceux montrant un déficit de migration des lymphocytes chez les souris KO pour le gène de la β -arrestine 2 (Fong *et al.*, 2002) (Walker *et al.*, 2003) montrent une implication de cette protéine dans des fonctions immunitaires en régulant la motilité des cellules.

Les arrestines sont donc responsables d'une seconde cascade de signalisation via les MAP kinases qui se met en place une fois que la signalisation via les protéines G est terminée. L'activation de cette seconde voie de signalisation est essentielle pour de nombreuses fonctions cellulaires majeures telles que le chimiotactisme ou encore la régulation de la transcription de certains gènes. D'un point de vue médical, l'activation de cette voie de signalisation β -arrestine dépendante a un grand intérêt du fait que certaines molécules synthétiques peuvent activer uniquement cette voie. C'est le cas par exemple pour le carvedilol, un β -bloquant utilisé pour les insuffisances cardiaques, qui ne déclenche que la voie de signalisation spécifique des β -arrestines via les ERK (Wisler *et al.*, 2007).

3. Rôle dans la cascade de signalisation développementale (Voir Kovacs *et al.*, 2009)

La β -arrestine 2 intervient dans la voie de signalisation Hedgehog en interagissant avec le récepteur Smo (Smoothened) phosphorylé et activé. L'inactivation du gène codant pour la β -arrestine 2 dans un embryon de poisson zèbre (*Brachydanio rerio*) entraîne de nombreux effets phénotypiques similaires à ceux observés pour les mutants hedgehog tels que des défauts dans la formation des somites ou encore un développement lent des fibres. Le phénotype sauvage peut être restauré par une activation constitutive de la voie hedgehog (Wilbanks *et al.*, 2004). Un exemple de régulation de signalisation initiée par l'activation du récepteur Smo et médiée par les β -arrestines est présentée dans la Figure 9.

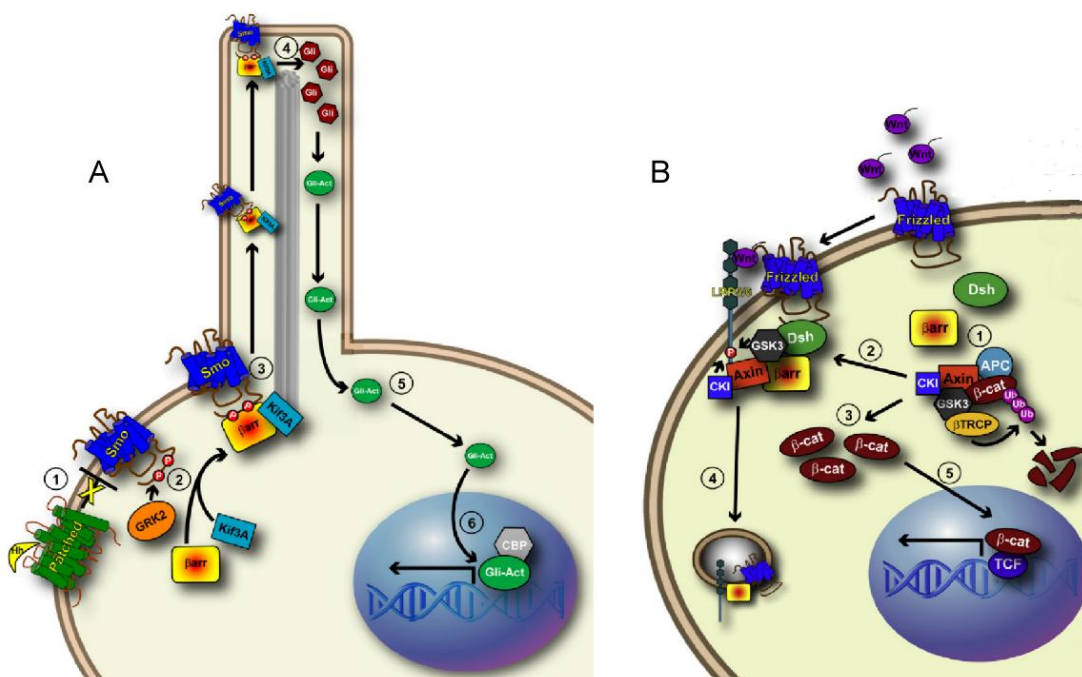


Figure 9 : Les β -arrestines interviennent dans la régulation de la signalisation développementale (Kovacs et al., 2009). **A.** Voie de signalisation Hedgehog (Hh) : l'interaction de Hh sur le récepteur Ptc lève l'inhibition imposée au récepteur smoothened (Smo) qui est alors phosphorylé et forme un complexe avec une β -arrestine et Kif3A (un moteur moléculaire). Smo va pouvoir activer Gli (médiators de signaux de la voie Hh) qui va être transloquée au noyau où il va activer la transcription de gènes cibles. **B.** Voie Wnt : en l'absence de stimulation du récepteur frizzled (Frz), le complexe Axin-APC (Adenomatosis Polyposis Coli) va dégrader la β -caténine et réprimer fortement l'activité transcriptionnelle. Lors de l'activation du récepteur par interaction avec Wnt, il forme un complexe avec la β -arrestine et Dishevelled (Dsh) qui retient l'axine et empêche ainsi la dégradation de la β -caténine qui est transloquée au noyau pour activer la transcription de gènes cibles. En parallèle, la β -arrestine internalise le récepteur.

4. Implication des arrestines dans l'apoptose

Les β -arrestines interagissent avec d'autres partenaires protéiques et interviennent dans différentes voies de signalisation comme l'apoptose en participant aux cycles de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine Akt (une protéine kinase B) en formant autour d'elle, après activation de récepteur de l'IGF1, un complexe comprenant en plus de Akt/PKB, son activateur, la PI3K (PI3kinase) et son inhibiteur, la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A) (Povsic et al., 2003) (Beaulieu et al., 2005). La stimulation du récepteur de l'IGF1 met en place un mécanisme anti-apoptotique via l'activation de la PI3K et de Akt, mais cette action anti-apoptotique nécessite la présence des β -arrestines ou tout du moins de la β -arrestine 1 (Povsic et al., 2003). La régulation d'Akt par les β -arrestines semble donc être un niveau de protection de la cellule contre l'apoptose. Ce rôle anti-apoptotique que pourraient jouer les β -arrestines semble confirmé par des observations faites sur des cellules déficientes en β -arrestine pour lesquelles, lorsque certains récepteurs (FPR ou AT_{1A}R) sont stimulés trop longtemps, l'apoptose est bien plus importante que chez les cellules sauvages (Revankar et al., 2004).

5. Régulation du système immunitaire par les β -arrestines

Bien que les β -arrestines soient présentes dans les cellules participant à l'immunité, leur rôle à ce niveau reste très peu étudié. Il a cependant été montré que les β -arrestines peuvent interagir avec la protéine TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6), nécessaire pour l'activation des facteurs NF- κ B et AP-1, deux activateurs transcriptionnels de l'immunité innée. Après activation du TLR-IL-1R (Toll like receptor-interleukin-1 receptor), le domaine C de la β -arrestine 1 ou 2 va interagir avec le domaine N de TRAF6, ce qui empêche l'activation des facteurs NF- κ B et AP-1. Chez les souris invalidée pour la β -

arrestine 2, une augmentation de la réponse inflammatoire et une diminution du seuil létal d'endotoxines sont observées (Wang *et al.*, 2006).

6. Rôle des β -arrestines au niveau du noyau et dans la régulation transcriptionnelle

Les β -arrestines 1 et 2 ont un signal de localisation nucléaire, mais seule la β -arrestine 2 possède un domaine d'export nucléaire. Ceci concorde avec les observations qui montrent la présence de la β -arrestine 1 dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau alors que la β -arrestine 2, qui est exportée du noyau par la protéine chaperon CRM1, est retrouvée exclusivement au niveau du cytoplasme (Scott *et al.*, 2002) (Kang *et al.*, 2005). La β -arrestine 2 semble avoir un rôle dans la régulation spatiale de certains de ses partenaires, comme la kinase JNK3 ou l'ubiquitine ligase Mdm2, qu'elle retient en partie dans le cytoplasme alors qu'ils sont normalement localisés dans le noyau (Song *et al.*, 2006) (Figure 8, insert).

Les β -arrestines régulent également, de façon plus ou moins directe, la transcription de certains gènes. Les arrestines se lient au facteur NF- κ B et l'empêchent d'aller activer la transcription au niveau du noyau (Witherow *et al.*, 2004). La β -arrestine peut aussi agir au niveau de la membrane plasmique en inhibant l'auto-ubiquitination de la protéine TRAF6 qui ne peut alors plus activer la kinase I- κ B. Son effet de dissociation du facteur NF- κ B avec sa protéine inhibitrice est inhibé et la transcription ne peut pas avoir lieu (Wang *et al.*, 2006).

Un autre exemple de régulation par les β -arrestines est observé au niveau des récepteurs δ et κ aux opioïdes. Après activation de ces récepteurs, la β -arrestine 1 est transloquée au noyau où elle provoque l'hyper-acétylation de l'histone H4 au niveau des promoteurs des gènes p27 et c-fos qui sont alors transcrits (Kang *et al.*, 2005).

Plus récemment, l'analyse protéomique des partenaires des β -arrestines a permis de révéler de nouveaux partenaires nucléaires. En interagissant avec certaines protéines telles que les ARN polymérases I et II ou encore des facteurs de transcription comme la myocardine ou STAT1, les arrestines participent à l'inhibition, ou au contraire à l'activation de la transcription de plusieurs gènes. Les arrestines sont également capables d'interagir avec certains facteurs de régulation des histones comme HDAC2 (enzyme permettant la dé-acétylation de lysine en N-terminal des histones). De plus, les β -arrestines semblent avoir un

rôle dans la maturation des ARNm et de leur traduction en interagissant avec des facteurs d'élongation comme eEF1A ou eIF-4B ou avec des protéines ribosomales (Xiao *et al.*, 2007) (Neuhaus *et al.*, 2006).

Enfin, les β -arrestines sont également impliquées dans la prolifération cellulaire où elles ont un rôle dans l'atténuation du signal mitotique (Schmid and Bohn, 2009).

III- Description

A. Caractéristiques générales

Alors que les arrestines visuelles ne sont présentes que dans les cellules photo-réceptrices, les β -arrestines sont présentes de façon ubiquiste dans toutes les cellules de l'organisme (Attramadal *et al.*, 1992; Parruti *et al.*, 1993).

Les arrestines interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires et de nouveaux rôles ne cessent d'être mis en évidence. Ceci peut s'expliquer par le nombre et la variété des partenaires retrouvés notamment pour les β -arrestines 1 et 2 (337 partenaires potentiels pour ces 2 protéines) (Xiao *et al.*, 2007). Les arrestines peuvent interagir aussi bien avec des protéines de signalisation cellulaire (kinases et phosphatases, protéines de la famille des petites GTPases), des protéines impliquées dans le trafic de vésicules (AP-2 ou VPS35), des facteurs d'organisation du cytosquelette (actine, tubuline, vimentine) ou encore des acides nucléiques (interaction avec des protéines d'interaction à l'ADN et des facteurs de transcription, entre autre) ou des protéines chaperons. Ces partenaires étant localisés dans différents compartiments subcellulaires, ceci suggère une organisation spatiale des arrestines très diversifiée également (52 % des partenaires sont cytosoliques, 26 % sont nucléaires et 5 % sont membranaires, les autres étant distribués dans les différents compartiments cellulaires) (Xiao *et al.*, 2007).

B. Données structurales

Les premières données structurales sur les arrestines ont été obtenues à la fin des années 1990 par l'étude aux rayons X de l'arrestine 1 (S) de bœuf (Granzin *et al.*, 1998). Les résultats

montrent que l'arrestine est composée de deux régions organisées en feuillets β antiparallèles avec une extrémité C-terminale très flexible (résidus 361 à 418) et un regroupement d'acides aminés chargés au cœur de la protéine. Cette étude indique également que la région d'interaction avec la rhodopsine phosphorylée se situe sur la région N-terminale entre les acides aminés 158 et 185.

La première structure cristallographique des β -arrestines, obtenue en 2001 à une résolution de 1.9 Å avec la β -arrestine 1 bovine tronquée, confirme la forme allongée, quasi exclusivement en brins β de la β -arrestine (Han *et al.*, 2001). La structure complète de la β -arrestine 1 a été rapidement résolue par la suite (Milano *et al.*, 2002). La très forte homologie entre les β -arrestines 1 et 2 a permis de modéliser la structure de la β -arrestine 2 à partir des données cristallographiques obtenues pour la β -arrestine 1.

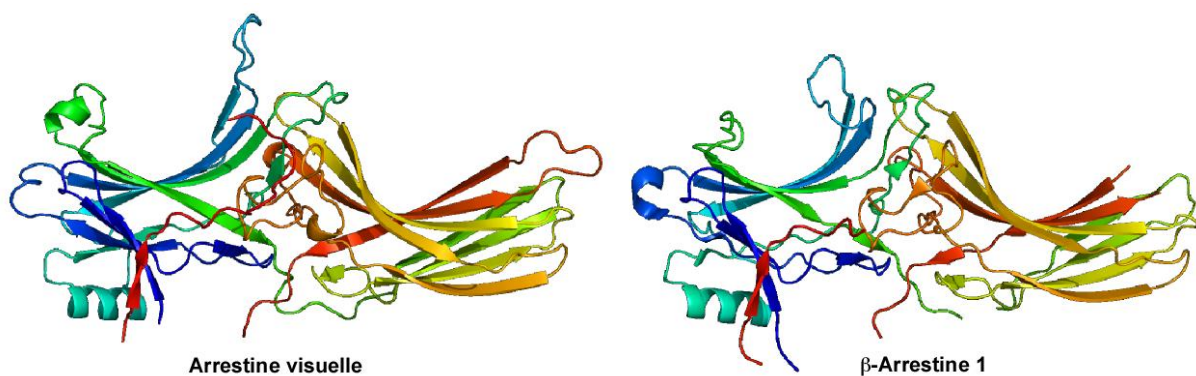


Figure 10 : Comparaison de la structure tridimensionnelle de l'arrestine visuelle et de la β -arrestine 1. Les structures des deux protéines apparentées (1CF1 pour l'arrestine visuelle, 2WTR pour la β -arrestine 1) sont visualisées avec le logiciel Pymol (<http://www.pymol.org>).

Ces données cristallographiques ont permis de montrer qu'en plus d'avoir une forte homologie et des rôles similaires (voir Figure 1), les arrestines visuelles et les β -arrestines ont également des structures très proches (Figure 10). Les β -arrestines sont organisées principalement en feuillets β antiparallèles. On peut observer des domaines N et C distincts et reliés par un cœur polaire sur lequel se replie l'extrémité C-terminale qui est alors inaccessible.

Plusieurs domaines particuliers ont pu être identifiés chez les β -arrestines, notamment un site d'interaction à la clathrine et un autre à la protéine adaptatrice AP-2, tous deux sur l'extrémité C-terminale de la protéine (Goodman *et al.*, 1996) (Figure 6).

C. Régulation

1. Activation

Les β -arrestines prennent une conformation active lorsque le cœur polaire rentre en contact avec l'extrémité cytosolique d'un RCPG activé et phosphorylé (Murakami *et al.*, 1993). Cette interaction entraîne la disruption du cœur polaire (désorganisation des charges) entraînant un changement de conformation des acides aminés 282 à 309 et la libération de l'extrémité C-terminale de la β -arrestine rendant ainsi accessibles les sites d'interaction à la clathrine et à l'AP-2 (Figure 6) (Han *et al.*, 2001).

La boucle reliant les 2 domaines N et C des arrestines joue un rôle important pour l'activation de la protéine. Si sa séquence est raccourcie, l'arrestine est moins apte à changer de conformation et perd de son activité (Vishnivetskiy *et al.*, 2002).

C'est la conformation stable et fermée du cœur polaire qui permet de garder l'arrestine en conformation inactive. Certains résidus impliqués dans le cœur polaire (Asp29, Arg169, Lys170, Asp290, Asp297, Arg393 pour la β -arrestine 2) sont très conservés entre les différentes arrestines et donc très probablement essentiels pour que la protéine soit fonctionnelle (Hirsch *et al.*, 1999). La modification de charge sur un seul acide aminé (Arg169 pour β -arrestine 1 ou Arg175 pour l'arrestine S) entraîne la désorganisation du cœur polaire. Une désorganisation constitutive du cœur polaire peut être introduite par substitution de l'arginine en jeu (R175E pour l'arrestine S, R169E pour la β -arrestine 1) et rend l'arrestine capable de lier aussi bien un récepteur phosphorylé que non phosphorylé. Ceci montre que le maintien d'une conformation inactive des arrestines est essentielle pour la régulation des RCPG (Gurevich and Benovic, 1997) (Kovoor *et al.*, 1999).

Il est à noter que les arrestines semblent pouvoir adopter plusieurs conformations actives différentes selon le récepteur par lequel elles sont activées. Ceci peut être dû à un profil de

phosphorylation spécifique présent sur l'extrémité C-terminale de chaque récepteur qui va engendrer différents profils d'ubiquitination sur les arrestines et déclencher une fonction spécifique (interaction avec un partenaire spécifique, localisation...) (Shenoy *et al.*, 2009).

2. Phosphorylation

La β -arrestine 1 possède un site de phosphorylation constitutif au niveau de la sérine 412 qui diminue son affinité pour la clathrine (Lin *et al.*, 1997). C'est uniquement sous sa forme active, et donc déphosphorylée, que la protéine peut interagir avec les récepteurs. Le retour de la protéine à un état inactif phosphorylé se fait grâce aux MAP kinases ERK 1/2 (Lin *et al.*, 1999).

La β -arrestine 2 est quant à elle phosphorylée au niveau de la thréonine 382 (Kim *et al.*, 2002). De même que pour la β -arrestine 1, cette phosphorylation est constitutive, mais la déphosphorylation ne semble pas nécessaire aux fonctions de la β -arrestine 2.

Lorsque les cellules sont mises en présence d'un agoniste (par exemple l'isoprotérénol qui active les récepteurs β -adrénergiques) on observe une diminution globale du nombre d'arrestines phosphorylées d'environ 20 %. Cependant, la déphosphorylation est très variable selon la localisation des arrestines. A la membrane plasmique, la totalité des arrestines est déphosphorylée. Au niveau du cytoplasme, aucune déphosphorylation n'est notée, et l'activation de récepteurs par l'agoniste n'a pas d'effet sur l'activation des arrestines. Enfin, la moitié environ des arrestines portées par des endosomes est déphosphorylée. Ces observations s'expliquent par le fait que le récepteur activé par l'agoniste va recruter les arrestines au niveau de la membrane plasmique où elles sont déphosphorylées, et son internalisation va conduire les arrestines non phosphorylées au niveau des vésicules endosomales (il faut noter en parallèle une forte augmentation de la quantité globale d'arrestines au niveau de la membrane plasmique et des vésicules après activation des récepteurs) (Lin *et al.*, 1997).

Des formes mimant un état constitutivement phosphorylé (S412D) ou constitutivement déphosphorylé (S412A) de la β -arrestine 1 ont permis de mettre en évidence le fait que la phosphorylation de l'arrestine n'est pas nécessaire que ce soit pour la désensibilisation ou pour l'internalisation du récepteur (ce qui est attendu étant donné que c'est l'extrémité C-

terminale de l'arrestine qui intervient dans cette interaction). Par contre, l'internalisation du récepteur est significativement plus efficace dans les cellules exprimant la forme S412A de la protéine. A l'inverse, les cellules qui expriment le mutant S412D voient quant à elles l'internalisation des récepteurs fortement diminuée par un effet dominant négatif de la protéine mutante qui ne peut pas exposer les sites d'interaction à la clathrine et à l'AP-2 (Lin *et al.*, 1997).

3. Ubiquitination

Les β -arrestines 1 et 2 sont poly-ubiquitinées, un état nécessaire pour l'internalisation clathrine-dépendante des récepteurs suite à leur activation. Cette ubiquitination se produit lors de l'interaction de l'arrestine avec le récepteur activé et est catalysée par l'ubiquitine ligase E3 Mdm2 (Shenoy *et al.*, 2001). Le temps de résidence des ubiquitines sur l'arrestine est plus ou moins long et dépend de la durée de l'interaction entre l'arrestine et le récepteur (Shenoy and Lefkowitz, 2005b). Par exemple, l'interaction de la β -arrestine 2 avec le récepteur β 2-AR forme un complexe de faible affinité et lors de cette interaction, l'arrestine prend une conformation propice pour interagir avec la déubiquitinase USP33 (Ubiquitin Specific Protease 33). Cela entraîne une déubiquitination rapide de la protéine et sa dissociation du récepteur. Une autre conséquence est que la β -arrestine ne peut pas activer les ERK et la voie de signalisation secondaire arrestine-dépendante. A contrario, la β -arrestine 2 forme un complexe assez stable avec le récepteur V2R et ne prend pas une conformation propice à l'interaction avec USP33. La β -arrestine est ubiquitinée plus longtemps, l'interaction entre le récepteur et l'arrestine est prolongée et la β -arrestine 2 peut activer une voie de signalisation secondaire via les ERK (Shenoy *et al.*, 2009).

En plus d'être elles-mêmes ubiquitinées, les arrestines participent à l'ubiquitination de partenaires. Par exemple, l'ubiquitination et la dégradation rapide du récepteur aux chémokines CXCR4 après son activation semblent être au moins en partie régulées par l'arrestine. La β -arrestine 1 possède un site d'interaction avec la protéine AIP4 (Atrophin Interacting Protein 4) qui est masqué lorsque l'arrestine est dans un état inactif et qui devient accessible suite à l'interaction avec le récepteur CXCR4 activé. La β -arrestine 1 interagit faiblement avec l'AIP4 en absence de stimulation et cela suppose la présence d'un second site

d'interaction d'affinité plus faible. Des expériences de pull down ont permis de montrer que l'arrestine interagit directement avec l'un des quatre domaines WW de AIP4. D'autres domaines de AIP4 entrent peut-être en jeu, notamment pour l'interaction de faible affinité, mais rien n'est démontré. Le site d'interaction avec AIP4 se situe au niveau du domaine N de l'arrestine entre les résidus 161 et 260. L'inhibition de la β -arrestine 1 a pour conséquence d'empêcher la dégradation du récepteur qui est cependant toujours ubiquitiné et internalisé. L'action de l'arrestine ne se situe donc pas au niveau de l'ubiquitination du récepteur, mais plus en aval. L'interaction entre la β -arrestine 1 et AIP4 se fait au niveau des endosomes. Elle pourrait entraîner un temps de résidence du récepteur plus long sur l'endosome ou bien provoquer un deuxième round d'ubiquitination suivi du ciblage du récepteur vers le lysosome. AIP4 n'a pas d'influence sur le niveau d'ubiquitination de la β -arrestine 1 (Bhandari *et al.*, 2007). De la même façon, les β -arrestines permettent l'ubiquitination du récepteur à l'IGF1 par la Mdm2 en servant d'adaptateur entre ces deux protéines (Girnita *et al.*, 2005).

4. Oligomérisation

La première structure obtenue pour l'arrestine 1 correspond à celle d'un tétramère composé de deux dimères asymétriques (Granzin *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1999) alors que la structure cristallographique de la β -arrestine 1 est celle d'un monomère pour la protéine complète et d'un oligomère si elle est tronquée (Han *et al.*, 2001) (Milano *et al.*, 2002). Cette oligomérisation se fait par les extrémités C-terminales des β -arrestines, alors que les interactions sur un oligomère d'arrestine visuelle ont lieu entre l'extrémité C-terminale d'une molécule et le domaine en feuillets β d'une autre.

Des données plus récentes obtenues par co-immunoprécipitation et par FRET tendent à confirmer que les β -arrestines sont présentes sous forme oligomérique dans la cellule et que ces oligomères peuvent s'associer entre eux (Storez *et al.*, 2005) (Milano *et al.*, 2006) (Xiao *et al.*, 2007).

Les β -arrestines ont deux sites d'interaction avec l'inositol hexakisphosphate (IP₆), un sur le domaine C-terminal avec une forte affinité ($K_d \approx 0.04 \mu\text{M}$) constitué par les résidus Lys232, Arg236, Lys250, Lys324 et Lys326 et l'autre d'affinité plus faible sur le domaine N ($K_d \approx 2.6$

μM) constitué des résidus Lys157, Lys160 et Arg161 (Figure 11A) (Sasakawa *et al.*, 1995) (Milano *et al.*, 2006). L' IP_6 pourrait alors servir de ligand de pontage des β -arrestines entre le domaine N d'une molécule et le domaine C de l'autre (Figure 11B). Ceci est confirmé par des expériences de filtration sur gel et de centrifugation analytique montrant une forte oligomérisation de la β -arrestine 1 (aussi bien homo-oligomérisation qu'hétéro-oligomérisation avec la β -arrestine 2) en présence d' IP_6 . Une forme mutée de l'arrestine dans le site d'interaction avec l' IP_6 empêche l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des β -arrestines, sans empêcher l'internalisation du récepteur, ni l'interaction de l'arrestine avec la clathrine, l'AP-2 ou encore ERK1 /2 (Milano *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2008). Ceci est en accord avec les résultats montrant que l'interaction entre le récepteur et la β -arrestine est inhibée par l'oligomérisation la β -arrestine (Gaidarov *et al.*, 1999).

Les arrestines ayant des rôles variés au niveau cellulaire, les différentes formes oligomériques de la protéine pourraient réguler en partie son activité. La présence de dimères de β -arrestines semble nécessaire à l'activation des ERK 1/2 (Xu *et al.*, 2008). L'état oligomérique semble également jouer sur la localisation de la β -arrestine 1 qui sous sa forme monomérique est plutôt nucléaire, alors qu'elle est majoritairement cytoplasmique sous la forme oligomérique (Storez *et al.*, 2005) (Milano *et al.*, 2006). L'oligomérisation dépendant de l' IP_6 régule donc la localisation cytosolique de l'arrestine en l'empêchant d'aller au noyau et d'interagir avec la membrane plasmique et augmente ainsi sa disponibilité lors de l'activation des récepteurs. Le rôle des β -arrestines comme protéines d'échafaudage dépend également de leurs état d'oligomérisation qui va moduler les affinités pour les différents partenaires (Xu *et al.*, 2008). L'affinité des arrestines pour l' IP_6 est très largement inférieure à leur affinité pour les RCPG (de l'ordre du micromolaire pour l' IP_6 et du nanomolaire pour les récepteurs). L' IP_6 ne rentre donc pas en compétition avec les récepteurs pour l'interaction avec l'arrestine au niveau de la membrane plasmique. Cependant, cette affinité de la β -arrestine pour l' IP_6 est suffisante pour que l' IP_6 rentre en compétition avec des complexes cytosoliques tels que les microtubules ou la calmoduline, qui ont également une affinité de l'ordre du micromolaire et des sites d'interaction situés sur la même face de l'arrestine.

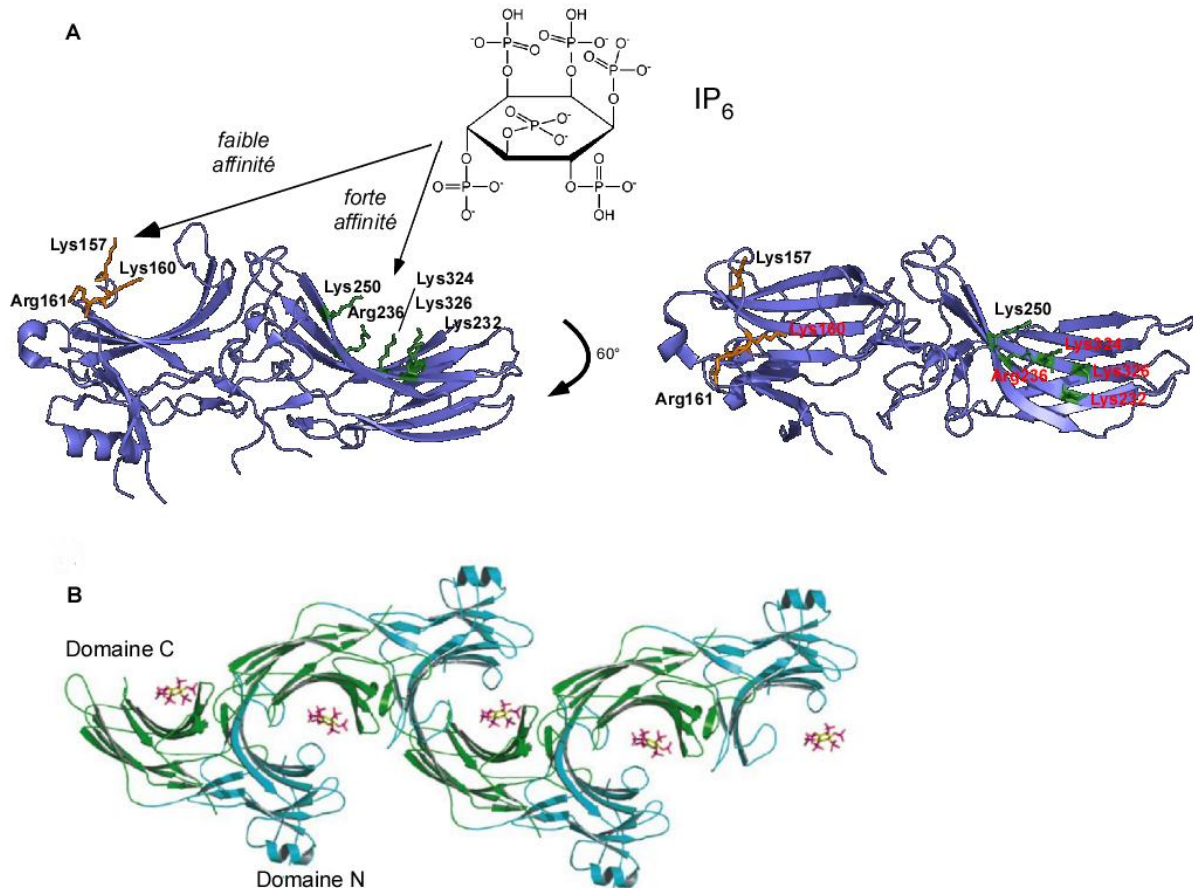


Figure 11 : Interaction avec l'IP6 et formation d'oligomères de β -arrestine 1. **A.** Interaction de l'IP6 avec la β -arrestine 1 sur deux sites distincts, l'un très affin sur le domaine N (acides aminés en vert) et l'autre sur le domaine C (acides aminés en orange). La molécule est aussi représentée après rotation de 60° pour mieux dégager les résidus impliqués. **B.** Modèle d'oligomérisation extrait de Milano et al (2006) de la β -arrestine 1 via ses deux sites d'interaction à l'IP6.

Une forte concentration d'arrestines est nécessaire pour observer la dimérisation spontanée de la protéine en présence d'IP6. Pour l'arrestine visuelle (arrestine 1), la concentration physiologique est suffisante pour la formation d'un tétramère, vu par immunoprécipitation et BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) (Storez *et al.*, 2005). Le tétramère d'arrestine est la forme prédominante dans les cellules en bâtonnets (Hanson *et al.*, 2007) (Imamoto *et al.*, 2003). Par contre, les concentrations cellulaires des β -arrestines et de l'arrestine 4, qui sont bien plus faibles, ne permettent pas la formation spontanée d'oligomères. La constante d'affinité pour la dimérisation des β -arrestines 1 et 2 est d'environ 100 μ M et celle de l'arrestine de cône est d'environ 500 μ M, alors que leurs concentrations cellulaires sont de 0,01 et 4 μ M, respectivement. L'existence de micro-domaines cellulaires avec des concentrations plus élevées en arrestines et permettant ainsi l'oligomérisation est une hypothèse envisageable (Hanson *et al.*, 2008). Le rôle d'une forme

oligomérique de l'arrestine 1 n'est pas encore bien défini mais semble nécessaire à une redistribution correcte de la protéine dans la cellule après activation par la lumière (Nair *et al.*, 2005). La forme tétramérique de l'arrestine visuelle est capable de se lier aux microtubules, mais seul le monomère interagit avec la rhodopsine activée (Hanson *et al.*, 2007). Le tétramère pourrait donc être une forme inactive stockée au niveau des microtubules et rapidement disponible en cas d'activation de la rhodopsine. Il est à noter également que la présence de forte concentrations d'IP₆ augmente les constantes d'association de l'arrestine 1 faisant passer sa constante de dimérisation de 37 à 120 μ M et sa constante de tétramérisation de 7.5 à 18 μ M. Ceci pourrait réguler la quantité de monomère dans la cellule afin qu'il y en ait toujours de disponible lors de l'activation de récepteurs.

L'oligomérisation des arrestines pourrait donc avoir plusieurs rôles, d'une part réguler les différentes fonctions cellulaires remplies par les arrestines, et d'autre part servir de système de stockage permettant de contrôler la quantité d'arrestine disponible pour les fonctions lui étant associées.

IV. La superfamille des arrestines

A. Les protéines à domaine arrestine (pour revue voir Aubry *et al.*, 2009)

La famille des arrestines est constituée, en plus des arrestines visuelles et des β -arrestines, de plusieurs autres protéines. Du fait de la diversité des fonctions associées aux arrestines, la dénomination d'une protéine comme appartenant à cette famille ne se fait pas en fonction de son rôle mais par rapport à la structure tridimensionnelle dite en « sandwich » spécifique des arrestines conventionnelles.

1. Homo sapiens

En plus des deux arrestines visuelles et des deux β -arrestines, neuf autres protéines présentent des domaines arrestine et sont modélisables à partir des données cristallographiques obtenues pour l'arrestine visuelle ou les β -arrestines : Vps26A et B, DSCR3, et 6 ADCs (Figure 12).

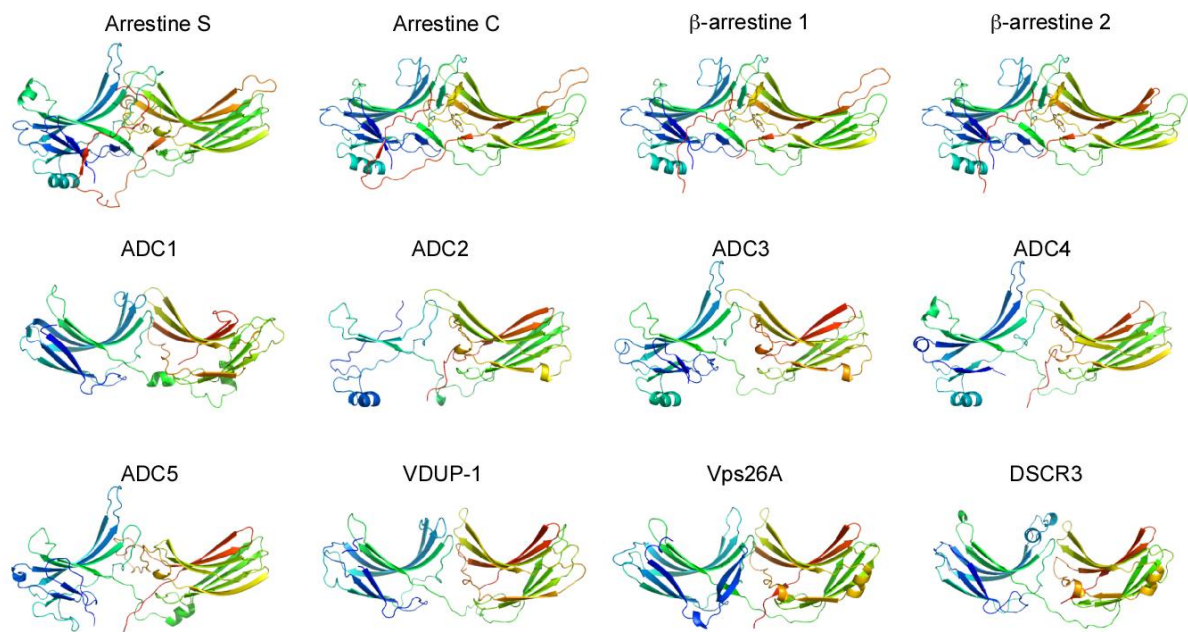


Figure 12 : Modélisation des structures tridimensionnelles des protéines humaines de la famille des arrestines. La structure 3D des protéines humaines du clan des arrestines a été modélisée grâce au logiciel Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) et visualisée grâce au logiciel Pymol. Les matrices cristallines utilisées pour la modélisation sont 1CF1 pour l'arrestine S, ADC2, ADC3, ADC4 et ADC5, 1JSY pour la β-arrestine 1, β-arrestine 2 et l'arrestine C, et 2FAU pour ADC1, Vps26A et DSCR3.

- **Vps26** fait partie d'un complexe appelé retromère, constitué des protéines Vps26-Vps35-Vps29 et des nexines de tri qui permet le transport rétrograde de protéines membranaires comme le récepteur mannose-6P des endosomes vers l'appareil de Golgi. Cette protéine semble présente chez tous les eucaryotes, même chez les plantes qui n'ont pas de vraies arrestines. La structure cristallographique de Vps26 a été résolue à 2.1 Å. Bien que sa composition en acides aminés est très différente elle garde un repliement très proche de celui des arrestines avec deux domaines organisés en feuillets β et connectés par un cœur polaire et une boucle de connexion flexible. Vps26 ne contient ni site d'ubiquitination, ni les domaines spécifiques d'interaction avec les RCPG, la clathrine, l'AP-2 ou encore les phosphatidyl inositol phospholipides. Mais, comme les arrestines, elle interagit à travers Vps35 avec la partie cytosolique de récepteurs membranaires (autre que RCPG) et elle conserve un réarrangement similaire aux arrestines qui pourrait la faire basculer d'un état inactif à un état actif (Shi *et al.*, 2006).

- **DSCR3** (Down sndrome critical region 3) est une protéine modélisable à partir de la structure de Vps26. DSCR3 est présente dans le noyau où elle pourrait réguler la transcription de certains gènes, notamment un gène impliqué dans la trisomie 21. Une analyse bioinformatique de cette protéine la prédit comme ayant un rôle dans la voie de signalisation MAP kinase (Hu *et al.*, 2006; Pellegrini-Calace and Tramontano, 2006).
- **ADC** (Arrestin domain containing protein) : plusieurs protéines de ce type existent chez l'homme, mais leurs fonctions restent encore inconnues. La structure des ADCs est modélisable à partir des données cristallographiques des arrestines bien que l'identité avec ces dernières soit relativement faible (11 à 15 %). Ces protéines possèdent des extensions du domaine arrestine et aucun cœur polaire ou structure similaire n'est retrouvé. Quelques études ont porté sur l'une de ces ADCs, VDUP-1. Cette protéine qui interagit avec la thioredoxine permet de réguler l'état redox de la cellule (Chen and DeLuca, 1994; Nishiyama *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000). Il a de plus été montré que la suppression de l'activité thioredoxine par VDUP-1 a un effet antiprolifératif et apoptotique (Schulze *et al.*, 2002; Billiet *et al.*, 2008). ADC3 a un effet suppresseur du cancer du sein en régulant négativement l'intégrine $\beta 4$ (Draheim *et al.*, 2010).

2. *Drosophila melanogaster*

On peut noter la présence, en plus de deux arrestines visuelles et d'un homologue de β -arrestine, de la protéine Kurtz qui présente plusieurs points communs avec ces dernières notamment sa capacité à interagir avec des récepteurs après leur stimulation (Johnson *et al.*, 2008). Elle régule entre autres le récepteur Notch vers lequel elle cible une E3 ubiquitine ligase, Deltex, qui va ubiquitiner le domaine intracellulaire de Notch envoyé par la suite vers une voie de dégradation (Mukherjee *et al.*, 2005) (Shenoy and Lefkowitz, 2005a). La drosophile possède également plusieurs autres protéines de type arrestine non caractérisées, 1 homologue de DSCR3, 1 homologue de Vps26 et 14 ADCs dont les fonctions ne sont pas caractérisées.

3. *Caenorhabditis elegans*

On retrouve une arrestine, ARR-1 qui a environ 65 % d'homologie avec les β -arrestines et qui possède un cœur polaire ainsi que des sites spécifiques d'interaction avec la clathrine et la sous unité $\beta 2$ de l'adaptine sur son domaine C. Cette protéine majoritairement exprimée dans les cellules neuronales, intervient dans l'adaptation olfactive mais semble également avoir un rôle dans le contrôle de la ponte des œufs qui est inhibée chez un individu *arr1*⁻. Dans les deux cas, l'intervention de ARR1 se fait au niveau des RCPG (Palmitessa *et al.*, 2005). Plusieurs ADCs ainsi que Vps26 sont également présentes chez *C. elegans*.

4. *Levures et champignons*

Onze protéines dont la structure est modélisable à partir des arrestines sont retrouvées. Ces protéines interviennent aussi bien dans la résistance à certains composés tel que l'o-dinitrobenzène pour la protéine Rod1p (Shinoda and Kikuchi, 2007), la réponse aux changements de pH avec Rim8 et PalF, la résistance à certains métaux comme le cadmium (Ecm21, Crs2) ou encore dans la machinerie autophagique (Aly1p, Aly2p). Ces protéines ont été appelées ARTs (Arrestin Related Trafficking adaptors) et elles régulent l'ubiquitination de certains cargos protéiques en recrutant une ubiquitine ligase de type HECT (Rps5) au niveau de la membrane plasmique en réponse à des stimuli spécifiques. Le niveau d'ubiquitination de ces cibles à la membrane plasmique va les diriger, après endocytose, vers une voie de recyclage ou de dégradation. Malgré des mécanismes très différents, le rôle des ARTs est comparable à celui des arrestines dans le sens où elles régulent l'endocytose de protéines membranaires (Lin *et al.*, 2008).

Le transporteur à manganèse Smf1 est également capable de transporter le cadmium qui est toxique pour la cellule. Smf1 est internalisé lorsque les cellules sont en présence de ce métal pour échapper à son effet toxique. L'endocytose de Smf1 nécessite son ubiquitination au préalable sur les Lys33 et Lys34 par Rps5. Comme aucun motif PY n'est présent sur Smf1, un adaptateur protéique est essentiel pour le recrutement de Rps5 qui possède un motif WW. Les protéines Ecm21 ou Csr2 (aussi appelées Art2 et Art8) qui sont des membres de la famille des arrestines sont capables d'interagir avec Rps5 grâce à leur motif PY et avec Smf1

phosphorylé, et permettent l'ubiquitination de Smf1 par Rps5. Une fois ubiquitiné et associé à Ecm21 ou Csr2, le transporteur est internalisé (Nikko *et al.*, 2008).

PalF chez *Aspergillus* (Rim8 ou Art9 chez *S. cerevisiae*) est impliquée dans des voies de signalisation induites par le pH. PalF malgré une faible similarité de séquence possède les domaines N et C des arrestines et se lie de façon stable et directe à deux régions différentes de l'extrémité C-terminale du récepteur PalH. La substitution S86P chez PalF a exactement le même effet que la substitution V53A chez la β -arrestine 1, une diminution de l'interaction avec les RCPG. Il y a probablement conservation du mécanisme d'interaction avec le récepteur entre ces deux protéines. Lorsque les cellules sont en milieu alcalin, PalH est activé et PalF phosphorylé sur un résidu sérine très conservé sur le domaine arrestine-N. *In vivo*, l'interaction entre PalH et PalF est nécessaire pour déclencher la voie de signalisation pH dépendante. Par contre et contrairement aux β -arrestines, PalF ne semble pas jouer un rôle de désensibilisation au niveau du récepteur en venant empêcher l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. Son rôle semble restreint à la signalisation (Herranz *et al.*, 2005).

5. *Dictyostelium discoideum*

Chez *Dictyostelium* on retrouve un homologue de Vps26, un homologue de DSCR3, Vps26L et 6 protéines à domaine arrestine, AdcA-F dont l'une, AdcA, a fait l'objet de ce travail de thèse.

B. Classification des arrestines

En 2008 Alvarez propose de classer les protéines de la famille arrestine en 2 types : les arrestines de type α et les arrestines de type β (à ne pas confondre avec les β -arrestines). Selon les critères d'Alvarez, les arrestines de type α ne possèdent pas d'hélice H1 dans leur domaine N, mais possèdent un motif PPxY d'interaction avec le motif WW des ubiquitines ligases. Par contre, les arrestines de la famille β , qui regroupe les arrestines visuelles et les β -arrestines, n'ont pas de motif PPxY (ou (P/L)PxY) et possèdent une hélice qui est séquestrée dans la conformation inactive de la protéine et probablement libérée dans sa conformation active. On retrouve également sur les arrestines de type β des sites d'interaction à la clathrine et à AP-2

qui ne sont pas présents sur les arrestines de type α (Alvarez, 2008) ; (Mittal and McMahon, 2009). De plus, les arrestines de type β sont majoritairement cytosoliques dans les cellules non activées alors que les arrestines de type α sont elles plutôt associées aux membranes.

Cette classification est toutefois ambiguë et discutable, car la modélisation tridimensionnelle des ADCs 2, 3 et 4 (qui sont de type α selon Alvarez) montre la présence d'une hélice α dans le domaine N. ADC 5, qui est également de type α selon Alvarez, ne possède ni hélice dans le domaine N ni motif PPxY (Aubry *et al.*, 2009).

PARTIE II. *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*

I. Dictyostelium, un organisme eucaryote unicellulaire capable de multicellularité

A. Historique

La souche NC4 de *Dictyostelium discoideum* qui est à l'origine de la souche utilisée dans notre laboratoire, est rencontrée à l'état sauvage dans l'humus des forêts tempérées de la Caroline du Nord, d'où la dénomination NC pour cette souche. Cet organisme a été isolé et cultivé pour la première fois de façon stable par Kenneth Raper en 1935. Les cellules possèdent à la fois des caractéristiques animales de type protozoaires (synthèse de glycogène) et végétales de type champignon (synthèse de cellulose). Le génome de *Dictyostelium* est d'une taille d'environ douze fois supérieure à celui d'*E. coli*, il est haploïde et organisé en six chromosomes (Eichinger *et al.*, 2005).

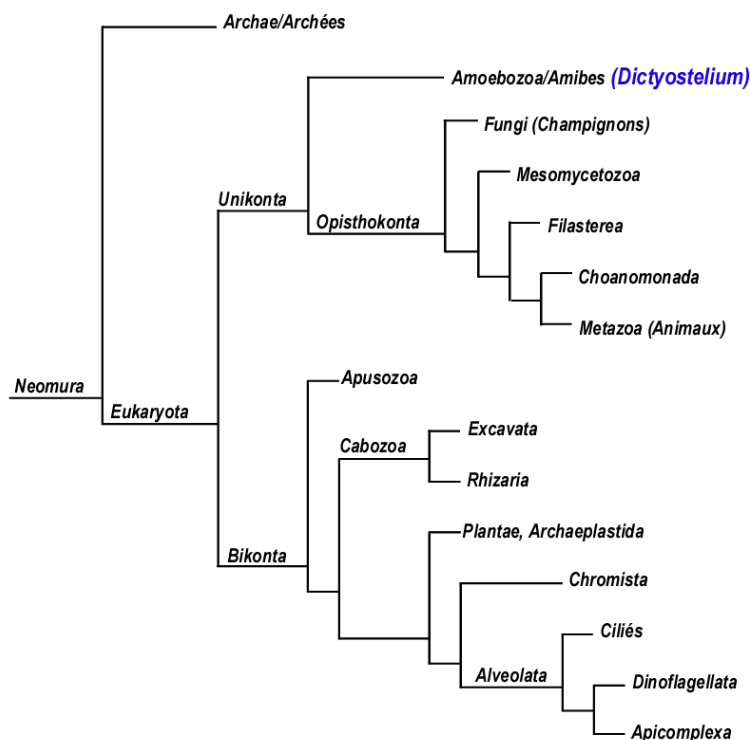


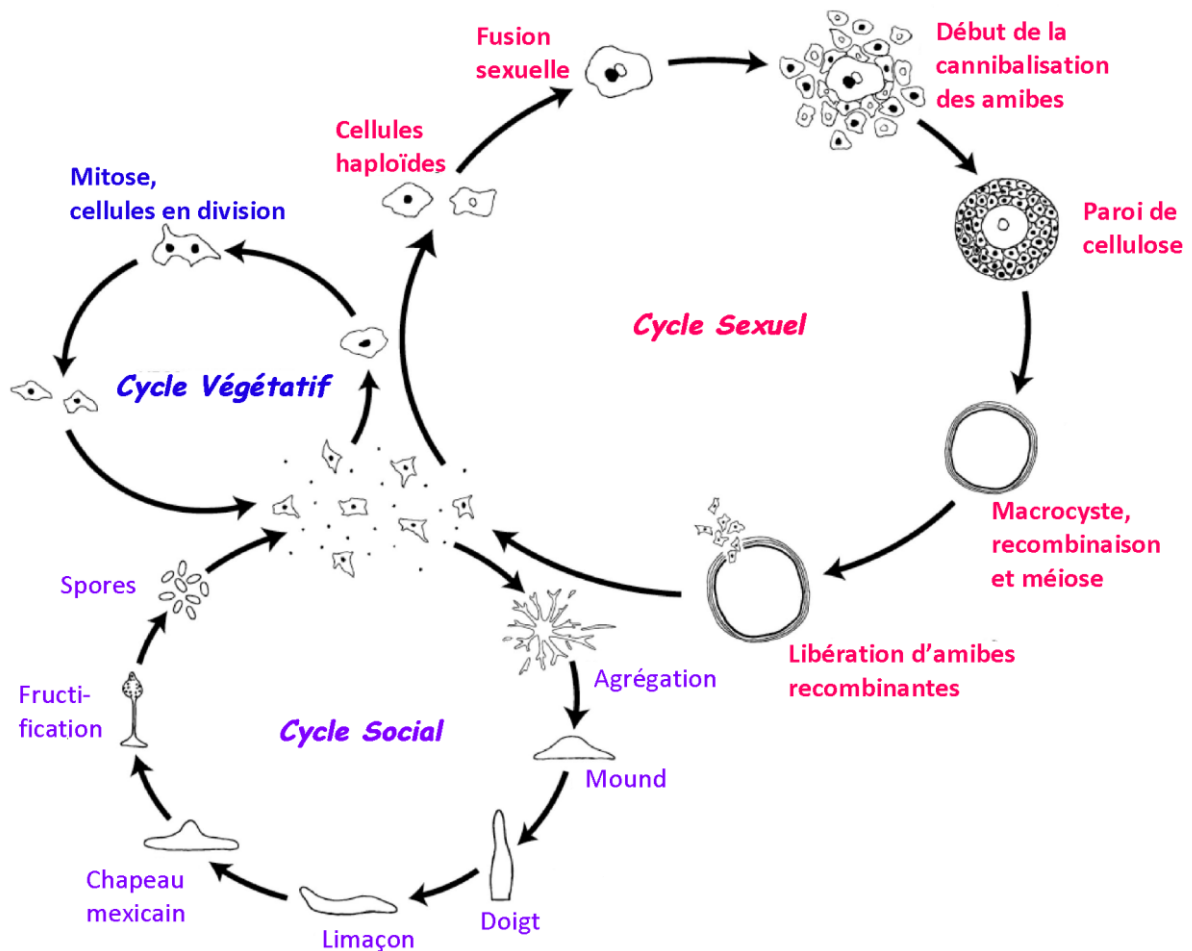
Figure 13. Cladogramme des Eucaryotes

Des souches diploïdes peuvent cependant apparaître de façon spontanée à une fréquence de 1/100000. D'un point de vue évolutif, *Dictyostelium* a divergé de la lignée animal-champignon après la séparation entre les plantes et les animaux (Eichinger *et al.*, 2005) (Figure 13). *Dictyostelium* peut être classé dans la famille des acrasiomycètes qui regroupe les organismes unicellulaires capables de s'organiser pour former une structure multicellulaire (Swanson *et al.*, 2002).

B. Cycle de vie

D. discoideum sous forme unicellulaire se nourrit par phagocytose de levures ou de bactéries (cycle végétatif) et se déplace grâce à des pseudopodes à une vitesse de l'ordre de 10 μm par minute, soit le diamètre moyen d'une cellule (Bonner, 1967; Raper, 1984). En présence de bactéries, le temps de génération de *Dictyostelium* est de l'ordre de quatre heures. En cas de carence en nutriment, les cellules arrêtent de se diviser et entament un processus qui va aboutir à la formation d'un organisme multicellulaire (Figure 14, cycle social).

Après un certain temps de jeûne, les amibes commencent à émettre un signal d'AMP cyclique relayé de proche en proche, ce qui va former un gradient que les cellules vont remonter par chimiotactisme jusqu'à former un amas d'environ 100000 individus. Cet agrégat de cellules va s'organiser en une structure en limaçon, capable de se déplacer en fonction d'un gradient thermique et lumineux. Les amibes agrégées vont ensuite se différencier en deux types cellulaires: la partie postérieure du limaçon va se différencier en cellules spores et la partie antérieure en cellules tiges qui meurent par un programme de mort vacuolaire (Golstein *et al.*, 2003) pour former une structure rigide capable de porter les spores (Loomis, 1975)(Figure 13). Les spores montrent une forte résistance à la dessiccation et à la carence nutritive et sont viables pendant plusieurs années dans des conditions favorables. La germination se déclenche lorsque les conditions favorables sont à nouveau réunies, c'est-à-dire une forte humidité, une température de l'ordre de 20°C et la présence de nutriments. Le cycle complet de différenciation se fait en 24 h et il est réversible jusqu'à l'étape du limaçon.

Figure 14. Cycles de *D. discoideum*

II. Les atouts du modèle

La capacité assez spectaculaire des cellules de *Dictyostelium* à se différencier pour former un organisme multicellulaire, mais également son impressionnante activité phagocytaire ont rapidement soulevé l'intérêt de chercheurs pour cet organisme. Dès 1937 K.B. Raper utilise *Dictyostelium* comme organisme modèle pour l'étude de la différenciation des cellules, et depuis 1999 *D. discoideum* est reconnu par le NIH (National Institutes of Health) comme modèle pour la recherche biomédicale.

Les souches utilisées en laboratoire, dérivées de la souche NC4, sont capables de se multiplier de façon axénique grâce à la sélection de deux mutations non caractérisées : *axeA* et *axeB*. Ces mutations permettent aux cellules de se nourrir par pinocytose en milieu liquide sans toutefois perdre leur capacité phagocytaire (Williams *et al.*, 1979). La sélection

successive de mutants ayant une croissance rapide a conduit à l'obtention d'une souche avec un temps de génération relativement court qui se multiplie dans un milieu simple permettant ainsi d'obtenir facilement et rapidement de grandes quantités de cellules ce qui est un avantage important notamment pour des approches biochimiques. *Dictyostelium* a un génome de 34 mégabases qui code pour environ 12500 gènes, ce qui est comparable à la drosophile chez qui on dénombre 14000 gènes, et supérieur aux génomes de bactéries (4000 à 5000 gènes) ou de levures (5000 à 6000 gènes) (Eichinger *et al.*, 2005). L'organisation haploïde du génome le rend particulièrement apte à la manipulation génétique. Différentes techniques telles que la surexpression ou l'invalidation de gènes, ou encore des techniques d'ARN interférant ont pu être développées. De plus le séquençage du génome permet également d'envisager des approches transcriptomique par puce à ADN ou protéomique par séquençage des protéines en spectrométrie de masse. Ces différentes caractéristiques font de *Dictyostelium* un modèle d'étude particulièrement intéressant pour divers problèmes biologiques tels que la différenciation (Beug *et al.*, 1973 ; Kessin, 1988 ; Williams *et al.*, 1989), la motilité (McRobbie and Newell, 1984 ; De Lozanne and Spudich, 1987 ; Egelhoff and Spudich, 1991), la division et la mort cellulaire (Golstein *et al.*, 2003). Il faut également noter que *Dictyostelium* possède des orthologues de nombreux gènes de mammifère impliqués dans des maladies, ce qui en fait un bon système pour la recherche biomédicale (Urushihara, 2009). Le système amibien est également utilisé pour l'étude de la relation hôte-pathogène avec des pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium spp* ou encore *Legionella pneumophila*. Il peut aussi servir de système de criblage pour tester la virulence de certains pathogènes et également, à l'aide de souche mutantes, permettre de déterminer les gènes de susceptibilité et de résistance de l'hôte (Steinert and Heuner, 2005).

III. Le répertoire amibien des RCPG

L'endocytose à récepteurs chez *Dictyostelium* reste relativement peu documentée, mais le séquençage du génome en 2005 a permis de mettre en évidence la présence de 55 récepteurs homologues aux RCPG de mammifères. Cela représente environ 0,5 % du génome, un chiffre à rapprocher des valeurs de 0,1 % du génome pour les RCPG de champignons et de 2 à 5 % chez les animaux. Les RCPG de *Dictyostelium* appartiennent aux grandes familles de RCPG de mammifères tels que les récepteurs GABA_B-like ou Frizzled-like, identifiés jusque là

uniquement chez les animaux. Les protéines G présentes : 14 sous-unités G_α , 1 sous-unité G_β et 1 sous-unité G_γ sont insuffisantes pour couvrir la totalité des 55 récepteurs avec une spécificité stricte. Ceci suggère la présence simultanée de voies de signalisation protéines G-dépendantes et -indépendantes. Une régulation du même type que chez les mammifères est donc envisageable chez l'amibe et pourrait faire intervenir des protéines d'échafaudage de type arrestines.

On retrouve également chez *Dictyostelium* des MAP kinases de type ERK1 et 2. Une implication de cette voie MAP kinases a été mise en évidence pendant le cycle de développement (Nguyen *et al.*, 2010). Il est plausible, comme chez les animaux, que cette voie MAP kinases puisse interagir avec les arrestines de *Dictyostelium* pour réguler certaines voies de signalisation.

IV. *Dictyostelium*, un modèle pour l'étude du trafic endocytaire

En plus des caractéristiques de *Dictyostelium* énoncées précédemment, l'amibe possède également des capacités de pinocytose et de phagocytose au moins égales à celles des macrophages et des neutrophiles qui sont des phagocytes professionnels. Cette propriété fait de l'amibe un excellent modèle pour l'étude des processus endocytaires et des mécanismes associés (dépendance vis-à-vis des filaments intracellulaires, régulation de la composition protéique du manteau de la cellule, trafic intracellulaire, signalisation...).

A. La macropinocytose

Comme indiqué précédemment, *Dictyostelium* a une forte activité pinocytaire qui lui permet d'internaliser jusqu'à 9 fL de milieu extérieur par minute par cellule, soit l'équivalent de son propre volume en une heure (Klein and Satre, 1986) et la totalité de sa surface membranaire en une quarantaine de minutes (Thilo and Vogel, 1980). Cette activité importante nécessite un apport de membrane conséquent pour remplacer le matériel endocyté. Celui-ci provient des vésicules synthétisées par l'appareil de Golgi qui fusionnent avec la membrane plasmique (Lefkir *et al.*, 2004) et du recyclage de vésicules post-lysosomales.

La formation des vésicules de macropinocytose est actine-dépendante. Environ une minute après l'internalisation, le manteau d'actine qui s'est formé autour de la vésicule se dépolymérise. L'endosome reçoit alors un apport important d'ATPase vacuolaire responsable de l'acidification de la vésicule (Clarke *et al.*, 2002) et d'enzymes lysosomales. Environ 30 minutes après l'internalisation, l'ATPase vacuolaire et les enzymes lysosomales sont triées des vésicules post-lysosomales, ce qui entraîne l'augmentation du pH de leur lumière jusqu'à la neutralité (Nolta *et al.*, 1994). Les produits indigestes sont exocytés par la cellule. La micropinocytose est quant à elle clathrine-dépendante et ne participe que peu à l'entrée de fluide dans la cellule.

B. La phagocytose (Cosson and Soldati, 2008)

La phagocytose est le mécanisme par lequel les cellules capturent et ingèrent des particules solides d'un diamètre de l'ordre du micromètre en les emprisonnant à l'aide de pseudopodes dérivés de la membrane plasmique. Chez les organismes multicellulaires, des cellules spécialisées dans la phagocytose permettent à l'organisme de se débarrasser de débris cellulaire et de certains pathogènes et servent également à activer le système immunitaire par la présentation d'antigènes. Les cellules phagocytaires sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, et la compréhension des différentes étapes de la phagocytose est un enjeu important dans le traitement de certains pathogènes résistants à ce mécanisme.

Les souches sauvages de *Dictyostelium* se nourrissent exclusivement par phagocytose de levures ou de bactéries, l'activité phagocytaire est donc très forte chez cet organisme. *Dictyostelium* est en quelque sorte un macrophage primitif ce qui rend particulièrement intéressante la recherche sur les mécanismes d'infection de cet organisme par certains pathogènes persistants, n'étant pas détruit dans les phagosomes et s'en servant même comme site d'incubation. Les voies phagocytaires de *Dictyostelium* et des phagocytes professionnels sont très similaires et dans les deux cas, les vésicules semblent passer par au moins trois niveaux de maturation. *Dictyostelium*, le premier organisme chez qui le rôle de l'actine dans le mécanisme de phagocytose a été mis en évidence, est donc un excellent modèle pour l'étude des différentes étapes de ce processus.

OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE

L'intérêt de *Dictyostelium* comme modèle d'étude, notamment des mécanismes de la voie endocytaire, a largement été démontré. Différents aspects tels que la compartimentation endosomale, l'évolution du pH endocytaire, la dépendance des processus endocytaires vis-à-vis du cytosquelette ou encore la caractérisation de la machinerie ESCRT ont été étudiés au laboratoire chez l'amibe. La présence chez *Dictyostelium* d'un large répertoire de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), parmi lesquels on trouve les récepteurs à l'AMPc qui interviennent dans le processus de chimiotactisme d'une part et de protéines à domaine arrestine (Adc) d'autre part, nous a suggéré une possible régulation de ces RCPG et de la signalisation en aval par les protéines Adc, à l'image de celle observée chez les cellules de mammifères pour les GPCR et les arrestines canoniques. La compréhension du rôle des protéines Adc amibiennes, dont les homologues très peu caractérisés existent chez les cellules eucaryotes supérieures, pourrait à terme permettre de mieux comprendre certains aspects de leur fonctionnement plus difficilement appréhendables chez les cellules mammaliennes.

Une fois identifiées les différentes Adcs de *Dictyostelium*, mon étude s'est d'abord axée sur la caractérisation d'un des membres de cette famille, la protéine AdcA, par l'étude structurale et biochimique de ses différents domaines et de leur rôle dans la localisation subcellulaire et l'oligomérisation de la protéine AdcA.

J'ai prolongé ces travaux par la caractérisation fonctionnelle de AdcA, notamment grâce à la construction d'un mutant *adcA* nul. Différents aspects de la physiologie de ce mutant tels que la croissance, les capacités endocytaires ou son cycle de développement ont été étudiés.

Enfin, dans un dernier volet, j'ai cherché à mieux comprendre la fonction d'AdcA à travers ses partenaires. Pour cela, deux approches de recherche de partenaires ont été utilisées, le système double hybride en levure et la co-immunoprécipitation.

MATERIELS
ET
METHODES

I. Techniques de biologie cellulaire

A. Souches et conditions de culture cellulaire

1. *Dictyostelium discoideum*

Deux souches de *Dictyostelium discoideum* ont été utilisées au cours de mes travaux : la souche KAx-3 et la souche JH10. La souche KAx-3 est dérivée de la souche sauvage NC4 et se caractérise par la présence de 2 mutations ponctuelles non caractérisées, *axeA* et *axeB*, qui permettent la croissance des cellules en milieu axénique (Watts and Ashworth, 1970; Williams *et al.*, 1974). La souche JH10 est dérivée de la souche KAx-3 (Hadwiger and Firtel, 1992). Elle est auxotrophe pour la thymidine et doit être cultivée en présence de thymidine exogène (100 µg/mL).

Les souches KAx-3 et JH10 sont cultivées en milieu axénique (HL5) dont la composition est donnée dans le Tableau I. La croissance des cellules se fait à 21°C sous agitation (environ 180 tours par minute). Dans les conditions optimales, l'amibe a un temps de génération de l'ordre de 10-12 h et entre en phase stationnaire lorsque la densité cellulaire dépasse $1,5 \cdot 10^7$ cellules/mL. Les cellules peuvent également être cultivées sans agitation, en boîtes de Pétri au fond desquelles elles adhèrent. Dans ces conditions, elles sont recouvertes par quelques mm de milieu HL5 (10 mL/boîte). À confluence, la boîte (diamètre de 10 cm) contient environ $2 \cdot 10^7$ cellules. De façon générale, pour les expériences, les cellules sont prélevées à partir de cultures agitées en phase exponentielle, soit entre $2 \cdot 10^6$ et $8 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le nombre et la taille des cellules sont déterminés à l'aide d'un compteur de cellules Beckmann Coulter Z2.

Peptone (Oxoid)	14,30 g/l
Extrait de levure (Oxoid)	7,15 g/l
Maltose, H ₂ O	18,00 g/l
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	1,28 g/l
KH ₂ PO ₄	0,48 g/l
Dihydrostreptomycine sulfate	0,25 g/l

Tableau I : Composition du milieu de culture de *Dictyostelium discoideum* (Watts and Ashworth, 1970)

Les invalidations géniques sont faites par recombinaison homologue dans le locus du gène cible, soit d'une cassette de résistance à la blasticidine, soit de la cassette codant la thymidilate synthase. Cette dernière n'est utilisable que dans la souche JH10. La sélection se

fait alors par ajout de blasticidine dans le milieu axénique à une concentration de 7,5 µg/mL ou en milieu axénique sans ajout de thymidine. Les surexprimeurs sont cultivés en présence de généticine (20 µg/mL) ou de blasticidine (7,5 µg/mL) selon les vecteurs de surexpression mis en œuvre (liste des vecteurs annexe 3).

2. Bactéries

La souche de *Escherichia coli* utilisée pour les étapes de sous-clonage est XL1-Blue (Stratagène). Celle utilisée pour l'expression des protéines recombinantes est BL21-DE3 (Stratagène). Cette dernière n'exprime pas les protéases OmpT et Lon, ce qui permet de diminuer le taux de dégradation des protéines recombinantes. Les vecteurs utilisés pour la transformation des bactéries sont listés dans l'annexe 4.

Les bactéries sont cultivées en aérobiose, à 37°C (sauf quand mentionné différemment) en milieu LB liquide ou additionné d'agar (Tableau II).

BactoTryptone	10 g/l
Extrait de levure	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar (facultatif)	15 g/l

Tableau II : Composition du milieu Luria Broth

Le clonage de *Dictyostelium* se fait par étalement des cellules sur un tapis de bactéries *Klebsiella aerogenes*. Les bactéries sont cultivées en milieu SM⁺ et le clonage se fait sur boîte de SM⁺/3-agar (Tableau III). Au bout de quelques jours, des colonies deviennent visibles du fait de la phagocytose progressive des bactéries et de la multiplication des cellules à l'endroit de la colonie.

	SM ⁺	SM ⁺ /3
BactoPeptone	10 g/l	3,33 g/l
Extrait de levure	1 g/l	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	3,5 mM	3,5 mM
KH ₂ PO ₄	14 mM	14 mM
MgSO ₄	4 mM	4 mM
Glucose	56 mM	18,6 mM
Agar		15 g/l

Tableau III : Composition des milieux SM⁺ et SM⁺/3

3. Levures

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée dans ce travail est la souche EGY48 qui est auxotrophe pour la leucine, l'histidine, l'uracile et le tryptophane.

B. Electroporation de *Dictyostelium*

La transformation des cellules de *Dictyostelium* se fait par électroporation. Environ 1.10^7 cellules en phase exponentielle sont prélevées et laissées une quinzaine de minutes dans la glace avant d'être centrifugées pendant 5 minutes à 1000 x g. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 mL de tampon d'électroporation froid (10 mM Na/K phosphate pH 6,5 ; 50 mM saccharose). De 10 à 30 μ g d'ADN sont ajoutés à 800 μ l de cellules dans une cuve de 0,4 cm (espace inter électrodes). L'électroporation est réalisée à 1 kV et 3 μ F par deux pulses rapprochés.

Après l'électroporation, les cellules sont laissées en milieu axénique pendant 24 h puis soumises à la sélection idoïne.

C. Développement multicellulaire de *Dictyostelium*

Le développement multicellulaire est déclenché par la carence nutritive. Les cellules (2.10^7) sont centrifugées pendant 5 minutes à 1000 x g et lavées en 12 mM NaH_2PO_4 , pH 6,1 (ajusté avec du KOH) (= tampon Na/K phosphate) afin d'enlever tout le milieu nutritif. Le culot final est repris dans 80 μ L de tampon Na/K phosphate et des gouttes de dilutions successives au $\frac{1}{2}$ sont déposées sur des boîtes de tampon Na/K phosphate – agar additionné de 2 mM MgSO_4 et 0,2 mM CaCl_2 . Après séchage partiel des gouttes, les boîtes sont transférées à 21°C et photographiées sous loupe binoculaire toutes les 4 h sur une durée de 24 h pour visualiser les différentes étapes du développement.

D. Imagerie cellulaire

1. *Sur cellules fixées*

Les cellules sont déposées dans les puits de Labtek 8-puits sur lamelle dans 400 μ L de milieu axénique ou de Na/K phosphate à raison de 1.10^6 cellules/cm². Les cellules sont laissées à 21°C au fond des puits le temps qu'elles adhèrent (environ 20 min). Le milieu est aspiré et les cellules sont fixées pendant 15 min en 40 mM Mes-Na pH 6,5 contenant 4 % de

paraformaldéhyde (PFA) ou pendant 10 min en méthanol à -20°C. Les cellules fixées en PFA sont ensuite perméabilisées par ajout de 400 µL de méthanol froid (-20°C) suivi d'une incubation de 2 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite lavées en PBS (NaH₂PO₄ 3,8 mM ; Na₂HPO₄ 16,2 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,4) puis les sites de fixation non spécifiques sont bloqués en PBS contenant 0,5 % BSA pendant 1 h à température ambiante. Après cette étape de blocage, 200 µL d'anticorps primaire dilué en PBS (voir liste des anticorps annexe 1) sont ajoutés aux cellules. Après 1h d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées trois fois en tampon PBS + 0,1 % Tween 20 avant l'addition de l'anticorps secondaire, dilué en PBS (1 h à température ambiante). Les cellules sont à nouveau lavées trois fois par 400 µL de PBS + 0,1 % Tween 20 puis mises en présence de 1 µM DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) pendant 5 minutes avant un dernier lavage en PBS + 0,1 % Tween 20. Les cellules sont observées directement sans montage.

2. *Cellules non fixées*

Les cellules exprimant des protéines GFP ou RFP sont observées directement au microscope sans fixation. Dans ce cas, les cellules sont lavées plusieurs fois en milieu Na/K phosphate afin de retirer tout le milieu HL5 qui auto-fluoresce à certaines longueurs d'onde.

Au cours de ce travail, les cellules ont généralement été observées sur un microscope inversé Axiovert 200M Zeiss à l'objectif 63x. L'acquisition des photographies a été réalisée grâce au logiciel Axiovision permettant du *time lapse* et des acquisitions en z. Afin d'améliorer la résolution des images prises sur cellules fixées, les sections optiques prises tous les 250 µm ont été déconvoluées sur Axiovision. Ponctuellement et quand mentionné dans le texte, les cellules ont été observées sur un microscope confocal Leica TCS-SP2.

E. Suivi de l'activité endocytaire

1. *Mesure de l'activité macropinocytaire*

L'activité pinocytaire est mesurée en suivant l'internalisation du marqueur de phase fluide FITC-dextran (Fluoresceine Isothiocyanate-dextran). Environ 2.10⁸ cellules sont prélevées d'une culture en phase exponentielle puis sédimentées par centrifugation à 1000 x g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est repris dans 18 mL de milieu axénique et mis en agitation à 21°C. Après une période de récupération d'une quinzaine de minutes, le FITC-

dextran est ajouté à la suspension cellulaire à une concentration finale de 2 mg/mL. Des prélèvements de 1 mL sont réalisés toutes les 15 minutes pendant 2h. Les cellules prélevées sont immédiatement diluées dans 10 mL de 20 mM Mes-Na, pH 6,5 contenant 0,05 % de BSA glacé afin de stopper le trafic endocytaire. Les cellules sont ensuite lavées deux fois afin d'éliminer le FITC-dextran extracellulaire. Le culot est repris dans 1 mL de Mes-Na 20 mM pH 6,5. Un prélèvement de 25 μ L permet de dénombrer les cellules, le reste de la suspension est lysé par ajout de 2 mL de tampon de lyse (100 mM NaPi pH 10,5, 0,25 % Triton X-100). La fluorescence du lysat est mesurée avec un fluorimètre aux longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} = 470 nm et d'émission λ_{em} =520 nm. Le volume de fluide internalisé par les cellules est déduit d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir du milieu de culture contenant le FITC-dextran et exprimé en fl de milieu extracellulaire internalisé par cellule.

2. Marquage des compartiments macropinocytaires

Les cellules sont mises en présence de 5 mg/mL de TRITC-dextran pendant cinq minutes (pulse) puis lavées trois fois en 20 mM Mes-Na pH 6,5. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans le même milieu mais sans le marqueur (chasse). Des prélèvements de cellules sont réalisés au cours de la chasse et les cellules sont observées immédiatement en microscopie à fluorescence afin de suivre l'évolution du marqueur le long de la voie endocytaire.

3. Mesure de l'activité phagocytaire

Afin de mesurer l'activité phagocytaire des cellules, l'internalisation de billes fluorescentes (Fluoresbrite YG 1 μ M ; Polysciences) a été suivie par FACS. Des cellules en phase exponentielle de croissance sont remises en suspension dans 10 mL de milieu HL5 à une densité de 2.10^6 cellules/mL. Après 10 minutes de récupération à 120 rpm à 21°C, 4.10^9 billes fluorescentes sont ajoutées. Après ajout des billes ($t=0$), 500 μ L de la suspension cellulaire sont prélevés à 0, 10, 20, 40 et 60 minutes et lavés 2 fois par du milieu HL5 froid. Le culot cellulaire est finalement repris dans 500 μ L de tampon (Na/K phosphate ; sorbitol 120 mM) puis la quantité de billes internalisées par phagocytose est mesurée par FACS (FACS calibur).

II. Techniques de biologie moléculaire

A. Sous-clonage

1. *Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Les différentes constructions de surexpression et d'inactivation ont été réalisées à partir de fragments amplifiés par PCR. Deux types de polymérases sont utilisées. La Taq polymérase (Fermentas) qui a un taux d'erreur élevé ($2,2 \cdot 10^{-5}$ erreur par nucléotide par cycle) est utilisée pour des contrôles (vérification de la présence d'un insert ou vérification de la taille d'un gène notamment) ou pour la synthèse de sondes pour les Southern et Northern blots. La Vent polymérase (New England BioLabs) qui est plus fidèle ($1,1 \cdot 10^{-6}$ erreur par nucléotide par cycle) est utilisée pour l'amplification de fragments en vue de sous-clonage.

Les réactions de PCR se font sur un volume de 100 μ l dans un milieu contenant :

- Pour la Taq polymérase : le tampon fourni avec l'enzyme à une concentration finale de 1X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de chaque dNTP, 500 nM de chaque oligonucléotide, 0,1 à 1 μ g d'ADN et 2,5 unités de Taq polymérase.
- Pour la Vent polymérase : le tampon fourni avec l'enzyme à une concentration de 1X, 2 mM de $MgSO_4$ et 1 unité d'enzyme, pour le reste, les composants et les concentrations sont les mêmes qu'avec la Taq.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (MJ Research PTC-200) selon le principe habituel: une étape de dénaturation complète de l'ADN (5 minutes à 95°C) suivie de 25 à 30 cycles de (1) dénaturation (1 minute à 95°C), (2) hybridation des oligonucléotides sur l'ADN à amplifier (1 minute à une température allant de 54 à 60 °C selon la teneur en GC des oligonucléotides) et (3) élongation de l'ADN (72°C pendant une durée de 1 minute pour chaque 1000 paire de bases à amplifier). Enfin la PCR se termine par une étape d'élongation de 10 minutes à 72°C pour que toutes les synthèses d'ADN ayant débuté se terminent.

À noter que, dans le cas d'une amplification sur un gène contenant des introns (très riches en AT) l'étape d'élongation se fait à 65°C et le temps d'élongation est ajusté en fonction de la taille des introns.

2. *Amplification d'ADN par RT-PCR*

Cette technique a été utilisée pour amplifier de l'ADNc à partir d'ARNm notamment pour toutes les expressions prévues en bactéries et en levures. La réaction de RT-PCR est réalisée à l'aide du kit PROMEGA (One-step RT-PCR) en suivant les instructions du fournisseur. La première étape consistant à synthétiser de l'ADNc à partir de fragments d'ARNm se fait grâce à une reverse transcriptase (AMV RT issue de *Avian Myeloblastosis Virus*) pendant 45 minutes à 48°C ; s'ensuit une PCR classique de 30 à 40 cycles avec la polymérase Tfl.

3. *Digestion de l'ADN et purification de fragments à partir de gel d'agarose*

Dans une optique de sous-clonage, fragments et plasmides sont digérés par des endonucléases spécifiques. La digestion se fait à raison de 3 unités d'enzyme par µg d'ADN pendant 1h à 37°C dans le tampon préconisé par le fournisseur. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en 0,5X TAE contenant 0,005 % de bromure d'éthidium, puis observés sous lampe UV. Les bandes d'intérêt sont excisées du gel, puis purifiées à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) suivant les indications du fournisseur. L'ADN ainsi purifié est élué par 30 à 50 µL d'eau distillée. Les produits de PCR sont purifiés à l'aide du même kit.

4. *Ligation de l'ADN*

La réaction de ligation vecteur + insert se fait grâce à la T4 DNA ligase. Classiquement, 0,01 pmol de vecteur et 0,03 pmol d'insert sont utilisés soit un rapport insert/vecteur à peu près égal à 3. Les ligations sont faites sur la nuit à 16°C.

5. *Transformation de bactéries par choc thermique*

Produits de ligation et plasmides sont introduits dans les bactéries par choc thermique (soit dans la souche XL-1 Blue pour le sous-clonage, soit dans la souche BL21-DE3 pour l'expression de protéines recombinantes). Environ 100 µL de bactéries chimio-compétentes sont ajoutés à l'ADN. Après 15 minutes dans la glace, les bactéries sont soumises à un choc thermique pendant 1 minute à 42°C. Suite au choc thermique, 1 mL de milieu LB est ajouté

aux cellules qui sont placées à 37°C sous agitation pendant 45 min. Elles sont ensuite étalées sur une gélose de LB en présence de la sélection idoïne.

B. Extraction de plasmides

- *A partir de bactéries*

L'extraction et la purification de plasmides présents dans les bactéries se fait à l'aide de kits de type mini ou maxi prep Qiagen selon les instructions du fournisseur. Pour les mini-prep, l'extraction se fait sur une culture saturée de 2 mL. L'ADN plasmidique (quelques µg) est élué avec 30 à 50 µL de tampon TE. Pour les maxi-prep, l'extraction se fait à partir de 200 mL de culture saturée, ce qui permet l'obtention de plusieurs centaines de µg d'ADN plasmidique.

- *A partir de levures*

Environ 5 mL de milieu sélectif Glu-T (permettant de sélectionner uniquement le plasmide d'intérêt, voir chapitre double hybride) sontensemencés avec une colonie puis laissés 36h sous agitation à 30°C. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 x g puis le culot est repris dans 200 µL de tampon de lyse (NaCl 100 mM ; Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM ; Triton X-100 2 % ; SDS 1 %). Le lysat subit 3 à 4 cycles de congélation - décongélation dans l'azote liquide puis 150 µL de billes de verres de 0,17 mm de diamètre sont ajoutées et l'ensemble est vortexé pendant 2 minutes à température ambiante. Le lysat est extrait par ajout de 200 µL de phénol-chloroforme et centrifugé 3 minutes à 16000 x g après homogénéisation. La phase supérieure aqueuse est prélevée puis additionnée de 1/10 (soit 20 µL) d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu (soit 440 µL). L'ensemble est laissé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé 5 minutes à 16000 x g. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 70 % puis séché sous une hotte. L'ADN est repris dans 20 µL d'eau distillée et 10 µL de cette solution d'ADN sont utilisés pour la transformation de bactéries.

C. Extraction d'ADN génomique de *Dictyostelium*

Environ 2.10^7 cellules sont lavées en tampon Na/K phosphate, puis reprises dans 200 µL de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM ; EDTA 100 mM ; SDS 6% ; β mercapto-éthanol 2 % ;

pH 7,5). La lyse s'effectue ensuite en deux étapes. La première est un passage au four à micro-ondes pendant 15, 10 et 5 secondes à 1350 W et la seconde, une incubation de 10 minutes à 75°C après ajout de 200 µL de tampon de lyse supplémentaire.

L'extraction de l'ADN est réalisée par ajout de 400 µL de Tris-HCl 20 mM pH 9,5 et 500 µL de phénol-chloroforme suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 16000 x g après homogénéisation. La phase aqueuse est traitée une seconde fois par 400 µL de phénol-chloroforme puis l'ADN est précipité par ajout d'1/10 de volume de LiCl 8 M et de 2 volumes d'éthanol absolu. L'ADN est repris dans 40 µL de TE additionnée d'ARNase. Environ 5-10 µl sont utilisés pour une analyse par Southern blot et 1 µl pour une étude par PCR.

D. Southern blot

1. *Digestion / transfert ADN génomique*

L'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction permettant une analyse simple d'une région particulière du génome. Après digestion, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% en TAE et contenant 0,005% de bromure d'éthidium. Après migration, la qualité de la digestion est vérifiée sous lampe UV par l'obtention d'un profil de digestion spécifique des enzymes utilisées. Après migration, le gel est traité avec un milieu de dépurination (0,25 M HCl) pendant 20 min, de dénaturation (0,5 M NaOH ; 1,5 M NaCl) pendant 30 min puis de neutralisation (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 ; 1,5 M NaCl) pendant 30 min. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon chargée positivement par capillarité et fixé à la membrane par passage sous lampe UV. La membrane est ensuite traitée selon les instructions fournies dans le guide de l'utilisateur DIG system Roche.

2. *Préparation des sondes ADN DIG dUTP*

La synthèse des sondes se fait par PCR avec un des déoxynucléotides modifié. En effet, le principe de ces sondes non-radioactives est d'incorporer du DIG-11-dUTP (Digoxigenin-11-dUTP Roche) qui va remplacer une partie du dTTP. Au mélange réactionnel d'une PCR, sont ajoutés 200 µM de dATP, dGTP et dCTP, 170 µM de dTTP et 30 µM de

DIG-11-dUTP. L'incorporation de DIG-11-dUTP est vérifiée par migration d'une fraction aliquote sur gel et se traduit par un retard de migration.

3. Hybridation

Cette étape se fait selon les indications du fournisseur. La membrane est préhybridée 2h à 42°C en présence de 20 ml de tampon Dig Easy Hyb (Roche). La sonde est dénaturée (10 minutes à 100°C) puis ajoutée à la membrane. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant une nuit dans la solution DIG Easy Hyb, le tout en rotation dans un four à hybridation.

4. Révélation

Après hybridation et lavages de la membrane, celle-ci est mise en présence d'un anticorps anti-DIG fusionné à la phosphatase alcaline. Le substrat utilisé, le CDP-Star, permet une révélation par chimioluminescence. La taille des fragments est déduite grâce aux marqueurs d'ADN « DIG-labeled DNA Molecular-Weight Marker III » de Roche.

III. Techniques de biochimie

A. Analyse des protéines

1. Dosage des protéines par la méthode à l'acide bicinchoninique

La solution protéique est diluée dans 2 mL d'un mélange acide bicinchoninique/sulfate de cuivre (50:1). Après 30 minutes d'incubation à 60°C, l'absorbance est mesurée à 562 nm. Une gamme étalon est réalisée avec 0, 10, 20, 30, 40 et 50 µg de BSA.

2. Électrophorèse en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide

Les échantillons sont solubilisés ou dilués dans le tampon dénaturant de Laemmli puis chauffés pendant 3 minutes à 96°C afin de finir la dénaturation. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dont la concentration est ajustée en fonction de la taille des protéines à séparer.

3. Coloration au bleu de Coomassie

Après séparation sur gel, les protéines peuvent être colorées directement dans le gel par une incubation en présence de Bleu de Coomassie (isopropanol 30 % ; acide acétique 10 % ; Brilliant Blue R-250 1 mg/mL). Le gel est ensuite décoloré par passages successifs dans plusieurs bains d'une solution de décoloration (isopropanol 10 % ; acide acétique 10 %).

4. Coloration au nitrate d'argent

Une méthode de coloration plus sensible que le bleu de Coomassie est le nitrate d'argent. Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont fixées par passage du gel dans 2 bains d'une solution de fixation (acide acétique 7,5 % ; éthanol 30 %) pendant au moins 30 minutes. Après rinçage du gel par 2 bains d'une dizaine de minutes dans de l'eau, le gel est mis pendant 1 minute dans une solution de sensibilisation ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à 0,3 g/L) avant de faire 2 nouveaux rinçages d'une minute à l'eau. Le gel est ensuite traité par un bain de 40 minutes dans une solution de nitrate d'argent à 2 g/L. Enfin, après un très bref rinçage à l'eau (une dizaine de secondes) le gel est plongé dans une solution qui va permettre la révélation des protéines (K_2CO_3 à 30 g/L ; HCOH 0,025 % ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$ à 10 mg/L) pendant 5 à 20 minutes. Enfin la coloration est arrêtée par passage du gel dans un bain Tris-HCl 0,3 M, acide acétique 2 % pendant au moins 30 min.

5. Immunodétection des protéines

Après leur séparation sur un gel de polyacrylamide, les protéines peuvent également être transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon P, Millipore) pour permettre leur immunodétection.

Après transfert, les sites non spécifiques de la membrane de PVDF sont saturés par immersion dans une solution de blocage (lait 5 % p/v ou BSA à 1 % p/v) pendant 1h. La membrane est ensuite incubée en TBS + 0,05 % Tween-20 (tampon TBS-Tween) contenant l'anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine cible (voir liste des anticorps annexe 1) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages en TBS-Tween, un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase est ajouté pendant 1h. Après lavages en TBS-Tween, la détection des protéines est faite par chimioluminescence avec le système Western Lightning

(Perkin Elmer). Dans le cas d'une révélation avec l'anticorps anti-His, l'anticorps primaire est directement couplé à la peroxydase.

B. Expression de protéines recombinantes

1. *Induction de l'expression*

L'expression des protéines recombinantes est réalisée dans la souche bactérienne *E. coli* BL21-DE3 préalablement transformée avec le plasmide contenant le gène codant pour la protéine à produire. Une culture saturée est diluée au 1/50 dans du milieu LB contenant de l'antibiotique adéquat à la sélection du plasmide puis mise à 37 °C avec agitation pendant environ 2h. Lorsque la densité optique mesurée à 600 nm est proche 0,8, l'expression de la protéine est induite par ajout de 1 mM d'IPTG (isopropyl thio- β -D-galactopyranoside). Le temps et la température d'induction sont adaptés en fonction de la solubilité de la protéine : 3 heures à 37°C pour le domaine H de AdcA ; 4 heures à 28°C pour le domaine H de AdcA en fusion avec la GST ; 4 heures à 30°C pour ArfA en fusion avec une étiquette poly histidine et 5 heures à 21°C pour le domaine arrestine C de AdcA en fusion avec la GST.

2. *Purification de protéines recombinantes*

2.1. *Purification sur colonne de nickel (étiquette poly-histidine ou domaine riche en histidines)*

Le culot bactérien d'une culture de 200 mL est repris dans 10 mL de tampon de lyse (10mM imidazole ; 50 mM NaH₂PO₄ ; 300 mM NaCl ; pH 8) auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéases (Aprotinine, Pepstatine, Leupeptine à raison de 1 μ g/mL et du PMSF à une concentration de 1 mM) et du lysozyme (1 mg/mL). La lyse se fait dans la glace pendant une trentaine de minutes et le mélange est ensuite traité aux ultrasons (5 minutes de sonication avec des pulses d'une puissance de 50 W et d'une durée de 5 secondes avec 2 secondes de repos entre chaque pulse).

Après deux centrifugations à 30000 x g pendant 15 minutes et à 150000 x g pendant 30 minutes qui vont permettre l'élimination des cellules non lysées, de l'ADN, des corps d'inclusions et des membranes, 1 mL de billes de Ni-NTA agarose (Qiagen), préalablement lavées en tampon de lyse, est ajouté au surnageant contenant la protéine à purifier.

L'ensemble est placé sur une roue (15 tours par minute) à 4°C pendant 2h. Les billes sont ensuite transférées dans une colonne Poly-prep (BIO-RAD) puis lavées par plusieurs passages de 10 mL de tampon de lavage (de 20 à 100 mM imidazole ; 50 mM NaH₂PO₄ ; 300 mM NaCl ; pH 8). L'élution se fait par fractions de 500 µL avec du tampon d'élution (150 mM imidazole ; 50 mM NaH₂PO₄ ; 300 mM NaCl ; pH 8). La quantité de protéine est estimée par un dosage à l'acide bicinchoninique (Cf chapitre sur l'analyse des protéines)

2.2. Purification de protéines en fusion avec la GST

Le culot d'une culture bactérienne (400 mL pour le domaine C_{GST} ou H_{GST} ; 100 mL pour la GST seule) est repris dans 10 mL de tampon de lyse I (PBS 1X ; EDTA 5 mM ; pH 7,4) en présence d'inhibiteurs de protéases (Aprotinine, Pepstatine, Leupeptine à raison de 1 µg/mL et du PMSF à une concentration de 1 mM) et du lysozyme (5 mg/mL). Après 10 minutes à 4°C, 10 mL de tampon de lyse II (PBS 1X ; EDTA 10 mM ; EGTA 5 mM ; DTT 3 mM ; pH 7,4) ainsi que du Triton X-100 (1 % final) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases sont ajoutés. La lyse est poursuivie encore 10 minutes à 4°C. Le lysat est traité aux ultrasons 12 fois 5 secondes à une puissance de 50 W (avec 5 secondes de repos entre chacun des pulses) ou jusqu'à ce qu'il ne soit plus visqueux. Après 10 minutes de centrifugation à 30000 x g et 30 minutes à 150000 x g permettant de clarifier le lysat, celui-ci est mis en présence de 0,5 mL de billes de glutathione-Sepharose (4 Fast Flow Amersham Biosciences) préalablement lavées dans un mélange 50/50 des tampons de lyse I et II. Ce mélange des billes et du lysat est placé sur une roue pendant 2h à 4 °C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois par 20 mL de tampon de lavage (PBS 1X ; EDTA 10 mM ; EGTA 5 mM ; DTT 3 mM ; Triton X-100 1%, ; pH 7,4) puis 2 fois par 1 mL de PBS 1X. La protéine n'est pas éluée à l'exception d'une fraction de 20 µL de billes qui est reprise en tampon Laemmli 2X afin de doser la quantité relative de protéine purifiée sur un gel de SDS-PAGE.

C. Pull down

Le pull down a été utilisé pour tester l'interaction entre deux protéines ou plus, en regardant si une protéine fixée sur un support est capable de retenir une ou plusieurs autres protéines présentes en solution. Dans notre cas, la protéine ArfA, exprimée en fusion avec une étiquette poly-histidine, et le domaine C du cœur arrestine de AdcA, exprimé en fusion avec une étiquette GST.

La quantité de chaque protéine purifiée est estimée sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante. La quantité de GST liée aux billes de glutathione-Sepharose (qui nous sert de contrôle négatif afin d'être sûr que la protéine Arf n'interagit pas avec la GST seule) étant très fortement supérieure à la quantité de arrestine C_{GST} purifiée, elle a été au préalable diluée 10 fois avec des billes de glutathione-Sepharose seules. Le pulldown est réalisé dans un volume final de 500 µL (volume de bille non compris) composé de 250 µL de tampon d'interaction 2X (40 mM Tris-HCl ; 50 mM NaCl ; 2 mM DTT ; 2 mM EDTA ; 0,4 % Triton X-100 ; 5 mM MgCl₂ ; pH 7,5), 40 µL d'éluat ArfA_{His}, 1 mM d'ATP et, selon le cas, 0,1 mM de GTPγS, 0,1 mM de GDPβS ou rien. Le mélange est complété à 500 µL avec de l'eau avant d'ajouter 40 µL de billes où est fixée la protéine arrestine C_{GST} (pour le contrôle 4 µL de billes avec la GST et 36 µL de billes vierges sont ajoutées). Ce mélange est mis pendant 1h sur une roue à 4 °C. Les billes sont lavées 5 fois par 500 µL de tampon d'interaction 1X (20 mM Tris-HCl ; 25 mM NaCl ; 1 mM DTT ; 1 mM EDTA ; 0,2% Triton X-100 ; 2,5 mM MgCl₂ ; pH 7,5) puis les protéines sont éluées dans 2 fois leur volume de tampon Laemmli 2X et dénaturées 3 minutes à 96°C. La présence de la protéine ArfA a été déterminée par Western blot.

D. Immunoprécipitation

Environ 2.10⁷ cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 x g puis lysées dans 1 mL de tampon de lyse (PBS 1X ; DTT 1mM ; EDTA 2 mM ; NP40 1 % ; pH 7,4) en présence d'inhibiteur de protéases (aprotinine, pepstatine et leupeptine à 1 µg/mL et du PMSF à 1 mM) pendant 15 minutes à 4°C. S'en suit une étape de centrifugation à 16000 x g pendant 15 minutes qui permet d'éliminer tous les débris cellulaires, l'ADN et les gros agrégats de protéines. Au surnageant (extrait total), est ajouté l'anticorps adéquat (voir liste des anticorps annexe 1) et 30 µL de protéine A-agarose (pour un anticorps issu d'un lapin ou d'un cobaye) ou 30 µL de protéine G-agarose (pour un anticorps produit chez une souris) préalablement lavés 3 fois par 1 mL de tampon de lyse. Ce mélange est mis sur une roue à 4°C pendant 1 heure à la suite de quoi les billes, après avoir été centrifugées 3 minutes à 500 x g, sont lavées 3 fois avec 1 mL de tampon de lyse puis éluées dans 100 µL de tampon Laemmli 2X. Les échantillons sont chauffés 3 minutes à 96°C puis centrifugés 1 minute à 16000 x g afin de rassembler la totalité des billes au fond du tube. Dans le cas d'une recherche informée de partenaires, 10 µL d'échantillon sont analysés par Western blot, et dans le cas d'une analyse

protéomique (ou pour estimer la quantité de partenaires de différentes formes de la protéine), 40 µL d'échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

Des IP ont également été réalisées uniquement à partir de la fraction membranaire. Dans ce cas 2.10^8 cellules sont cassées au cell-cracker dans 500 µL d'un tampon de casse (Tris-HCl 20 mM ; NaCl 110 mM ; pH 7), après quoi le volume est ajusté à 6 mL avec le même tampon de casse et divisé en 2 fractions de 3 mL. Une étape de centrifugation de 10 minutes à 1000 x g permet l'élimination des cellules non cassées. Le surnageant est alors prélevé et centrifugé pendant 30 minutes à 100000 x g. Un des culots obtenu est repris dans 1,5 mL de tampon de casse supplémenté de 1 % de NP40 alors que le culot de la seconde fraction est repris dans 1,5 mL de ce même tampon en présence de NP40 et contenant 2 mM d'EDTA. Les débris cellulaire non lysés sont éliminés par une étape de centrifugation de 15 minutes à 16000 g. La suite se déroule comme indiqué au dessus pour une immunoprécipitation classique.

E. Fractionnement subcellulaire

Environ 2.10^7 cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 x g. Le culot est repris dans 300 µL de tampon de casse (NaCl 110 mM ; DTT 1 mM ; pour les pH allant de 6 à 6,5 Mes-Na 20 mM, pour un pH de 7,0 HEPES-Na 20 mM et au-delà de 7,0 Tris-HCl 20 mM ; inhibiteurs de protéases Complete de Roche) auxquels sont ajoutés 30 µl de billes de verre (diamètre de 0,17 mm). Le tout est vortexé 3 fois 15 secondes afin de casser les cellules. Le volume est ajusté à 700 µL par addition de tampon de casse. Une centrifugation de 10 minutes à 1000 x g permet d'éliminer les billes ainsi que les cellules non cassées et les noyaux. Ce surnageant post-nucléaire (ou extrait total) est centrifugé à haute vitesse (100000 x g pendant 30 minutes), afin de séparer la fraction soluble (surnageant) de la fraction membranaire (culot). Une fraction aliquote de la fraction totale et de la fraction soluble est conservée. La totalité de la fraction membranaire est remise en suspension dans un volume équivalent à la fraction soluble par ajout de tampon de casse puis additionnée de tampon Laemmli. Des échantillons sont prélevés dans les différentes fractions (total, soluble et membrane) et analysés par Western blot.

F. Filtration sur gel

1. *Passage d'un extrait cytosolique total à travers une colonne de Sephacryl S300*

Environ 2.10^9 cellules surexprimant AdcA^{R/A} sont centrifugées 5 minutes à 1500 g puis remises en suspension dans 1 mL de tampon de casse (NaCl 150 mM ; Tris-HCl 25 mM ; pH 8) contenant ou non 1 mM d'EDTA. Après la casse, les cellules sont centrifugées 30 minutes à 100000 g pour ne récupérer que la partie soluble dans laquelle se trouve notre protéine d'intérêt. Le débit de la colonne de Sephacryl S300 est d'environ 100 μ L/min, et des fractions d'environ 1 mL sont récupérées en sortie de colonne pour un volume de colonne de 180 mL.

2. Passage du domaine H recombinant sur une colonne Sephadex G150

Le domaine H purifié est dialysé contre 1 L de tampon NaCl 150 mM ; Tris-HCl 25 mM ; pH 7,5. Avant d'être déposé au sommet de la colonne de gel filtration, la protéine purifiée peut être incubée avec 25 μ M de Ni²⁺ pendant 1 heure. Le débit de la colonne est de 100 μ L/min, et des fractions d'environ 0,8 mL sont récupérées en sortie de colonne pour un volume de colonne de 50 mL. L'élution du domaine H peut-être suivi soit sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie, soit par dosage protéique à l'acide bicinchoninique.

G. Résonance plasmonique de surface

La première étape consiste à activer les groupements carboxyles de la puce (Sensor Chip CM5 BIACORE) en faisant passer une solution de EDC/NHS 1 :1 (EDC = 1-ethyl-3-(3-dimethylpropyl)-carbodiimide 0,4 M ; NHS = N-hydroxysuccinimide 0,1 M). Ensuite, la CHIP activée est mise en présence du domaine H, dilué à 10 μ g/mL dans une solution d'acétate de sodium à pH 5, ce qui permet sa liaison covalente sur la puce. Le passage sur la puce d'une solution d'éthanolamine à 1 M permet de bloquer les sites activés sur lesquels la protéine ne s'est pas fixée.

Un flux de tampon (HEPES 25 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,5) contenant 20 μ g/mL du domaine H (analyte) passe sur la CHIP avec un débit de 5 μ L/min.

La fixation des protéines présentes dans l'analyte sur celles fixées sur la puce va entraîner une modification de l'indice de réfraction du milieu sous la couche d'or qui recouvre la lame de verre et affecter le faisceau lumineux qui arrive sur celle-ci, en particulier l'onde évanescente qui n'est pas réfléchi. La modification de l'indice de réfraction est

proportionnelle à la quantité de protéines qui interagissent ce qui permet de déduire une constante d'association protéine-protéine. L'interaction est testée dans différentes conditions. Le domaine H peut être dans le flux en présence de métal (25 μ M de nickel, zinc, calcium, cobalt ou cuivre) ou bien à différentes concentrations (de 1 à 50 μ g/mL). Les courbes ont été analysées selon l'équation de Langmuir (Aubry et al, 2002).

IV. Double hybride

Le système double hybride a été utilisé pour identifier de nouveaux partenaires d'AdcA.

La souche de levure utilisée est EGY48 qui a un phénotype *his⁻*, *leu⁻*, *trp⁻* et *ura⁻*. Elle possède dans son génome le gène *leu2* en aval des séquences de fixation de LexA. Le vecteur pLexA (ou pEG202) est utilisé pour cloner la protéine d'intérêt (ou appât, dans notre cas le cœur arrestine de AdcA) en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN LexA. Ce plasmide porte le gène *his3* qui va permettre de compléter le phénotype *his⁻* de la levure et donc de sélectionner les cellules ayant incorporé le plasmide. Le vecteur pB42AD (ou pJG4-5) permet le clonage d'une banque d'ADNc en fusion avec le domaine d'activation (peptide de 88 résidus activant la transcription chez la levure (Ma and Ptashne, 1987). L'expression des protéines correspondant à la banque d'ADNc est induite en présence de galactose grâce au promoteur inductible GAL1. Le gène *trp1* qui restaure l'autotrophie de la cellule pour le tryptophane permet la sélection des transformants. Enfin, le dernier vecteur utilisé est p8op-lacZ (ou pSHI8-34). Ce vecteur réplcatif à grand nombre de copies comporte le gène rapporteur *lacZ* en fusion avec les séquences opératrices de LexA. La sélection de la présence du vecteur se fait grâce au gène *ura3* qui complète le phénotype *ura⁻* de la souche EGY48. Les cartes des vecteurs pLexA et pB42AD sont présentées dans l'annexe 5.

Pour la transformation des levures, 10 mL de milieu de sélection approprié (composition tableau IV et V) sont inoculés avec une colonie et laissé une nuit sous agitation à 30°C. Cette pré-culture est diluée au 1/5 dans du YPD (composition tableau VI) et laissée sous agitation à 30°C jusqu'à une D.O.₆₀₀ de 0,6-0,8. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 x g à 4°C puis le culot est repris dans 10 mL de LITE (100 mM acétate de lithium ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 7,5). Les cellules sont de nouveau centrifugées 5 minutes à 1500 x g à 4 °C et le culot est repris dans 1 mL de LISORB (1 M sorbitol ; 100 mM acétate de lithium ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 7,5). Les cellules sont alors

prises en incubation pendant 30 minutes sous agitation à 30°C puis centrifugées 3 minutes à 2500 x g. Le culot est remis en suspension dans 125 µL de LISORB auquel sont ajoutés 20 µL d'ADN « carrier » (solution d'ADN de sperme de saumon à 10 mg/mL, Gibco) et 1 µg d'ADN plasmidique. Après 10 minutes à 30°C sans agitation, 900 µL de LIPEG (40 % PEG4000 ; 100 mM acétate de lithium ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 7,5) et 100 µL de DMSO sont ajoutés. Les cellules subissent alors un choc thermique de 12 minutes à 42°C suivi d'une centrifugation de 3 minutes à 2500 g. Les cellules sont reprises dans 100 µL d'eau, étalées sur une gélose contenant le milieu de sélection idoïne, puis placées à 30°C jusqu'à apparition de colonies.

Adénine	9.1 %
Histidine	32 %
Leucine	13.6 %
Lysine	13.6 %
Tryptophane	9.1 %
Tyrosine	13.6 %
Uracile	9.1 %

Tableau IV : Composition du mélange d'acides aminés (Mix) utilisé pour compléter le milieu minimum

Nitrogen base sans acides aminés	6.7 g/L
Glucose	20 g/L
Agar	15 g/L
Mix-UH	0.4 g/L
Mix-UHT	0.35 g/L
Mix-UHTL	0.25 g/L

Tableau V : Composition du milieu minimum pour la sélection des plasmides

Extrait de levure	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L
Agar (facultatif)	15 g/L

Tableau VI : Composition du milieu de culture YPD pour la culture non sélective de levure

Pour la transformation de la banque d'ADNc, le protocole est sensiblement le même, seuls les volumes changent. Une pré-culture de 10 mL est diluée dans 100 mL de Glu-UH et laissée sous agitation à 30°C jusqu'au lendemain matin. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 x g et le culot est repris dans 600 mL de YPD puis laissé à 30°C sous agitation jusqu'à une D.O.₆₀₀ = 0,6-0,8. La culture est centrifugée 5 minutes à 1500 x g à 4°C puis le culot est repris dans 20 mL de LITE. Les cellules sont de nouveau centrifugées 5

minutes à 1500 g à 4 °C et le culot est repris dans 12 mL de LISORB. Les cellules sont alors mises à incuber pendant 10 minutes sous agitation à 30°C puis centrifugées 5 minutes à 1500 g. Le culot est remis en suspension dans 2,5 mL de LISORB auquel sont ajouté 5 mg d'ADN « carrier » et 50 µg d'ADN plasmidique de la banque. Après 10 minutes à 30°C sans agitation, 22,5 mL de LIPEG et 2,5 mL de DMSO sont ajoutés. S'ensuit un choc thermique de 12 minutes à 42°C suivi d'une incubation à 30°C sous agitation pendant 4 heures après ajout de 500 mL de milieu Glu-UHT. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 1500 g à 4°C puis reprises dans 4 mL de Gal-UHTL. En contrôle, pour estimer l'efficacité de la transformation, 50 µL de dilutions au 1/10, 1/100 et 1/100 sont étalées sur un milieu gélosé Glu-UHT. Les cellules restantes sont étalées sur une gélose Gal-UHTL (200 µL par boîte de 14 cm de diamètre) puis laissées 5 jours dans une étuve à 30°C. Les clones qui apparaissent sont repiqués sur des milieux Gal-UHT-Xgal, Gal-UHTL et Glu-UHT. Les clones sélectionnés (ceux qui poussent sur Gal-UHTL et forme une colonie bleue sur Gal-UHT-Xgal) sont repiqués sur un milieu Glu-T pour ne sélectionner que le plasmide pB42AD contenant l'ADNc qui sera envoyé à séquencer.

RESULTATS

PARTIE I. IDENTIFICATION DES PROTEINES A DOMAINE ARRESTINE DE *Dictyostelium*

La disponibilité de la séquence complète du génome de *Dictyostelium*, établie en 2005, a permis de rechercher, à l'aide du logiciel BLAST 2.0 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), des homologues amibiens des différents membres de la superfamille des arrestines. Pour cette recherche, les séquences suivantes ont été utilisées : l'arrestine 1 de bœuf, la β -arrestine 1 humaine et un homologue de levure apparenté aux arrestines, PalF/Rim8. Ceci a permis de repérer six gènes codant pour des protéines à domaine arrestine que nous avons appelées AdcA à F pour *Arrestin-Domain-Containing proteins A -F*.

A l'exception d'AdcE chez laquelle seul le domaine C des arrestines a pu être identifié sans ambiguïté, AdcA, B, C, D et F de *Dictyostelium* présentent les deux domaines N et C des arrestines (Figure 15).

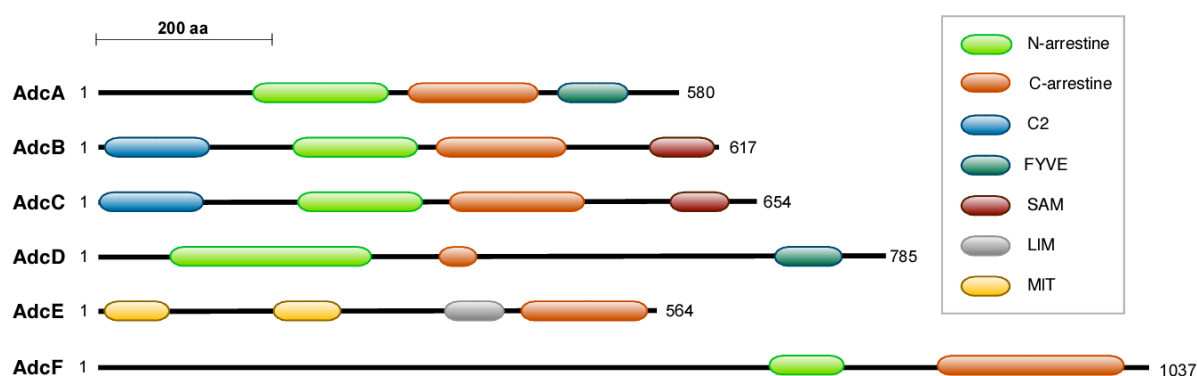


Figure 15 : Représentation schématique des six arrestines présentes chez *D. discoideum*. Les différents domaines ont été identifiés par les logiciels SMART et Pfam. Les domaines N- et C-arrestines sont représentés en vert et caramel, respectivement. Les domaines d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipide sont détaillés dans l'encart.

Le pourcentage d'identité et d'homologie du module arrestine de ces six protéines avec les différents membres de la superfamille des arrestines est relativement faible (Tableau VII), mais il est du même ordre voire supérieur à celui que partagent les protéines à domaine arrestine humaines (ARRDCs) ou les arrestines de *S. cerevisiae* avec les arrestines canoniques de mammifères (Herranz *et al.*, 2005; Alvarez, 2008; Aubry *et al.*, 2009).

De façon notable, les six protéines de *Dictyostelium* sont plus grandes (564 à 1030 acides aminés) que les arrestines canoniques (400 acides aminés en moyenne) du fait d'extensions de part et d'autre du cœur arrestine.

HOMOLOGIES (%)										
	Arr β 1	Arr S	ADC1	VDUP	PalF	AdcA	AdcB	AdcC	AdcD	AdcE
Arr β 1	-	65.7	18.0	22.2	18.9	16.7	22.1	21.5	12.3	11.9
Arr S	55.3	-	17.0	20.9	15.9	17.5	22.1	21.3	13.9	13.9
ADC1	10.0	9.0	-	25.6	13.1	16.4	16.7	14.6	12.3	9.4
VDUP	11.4	9.9	16.5	-	15.7	17.6	19.0	22.2	13.9	12.0
PalF	9.2	7.1	6.7	8.5	-	13.9	21.1	20.0	15.0	11.3
AdcA	8.4	10.6	8.8	7.9	5.5	-	20.5	20.2	11.8	10.5
AdcB	12.5	11.3	8.9	9.5	9.9	11.4	-	59.1	15.5	15.8
AdcC	11.1	11.6	7.6	12.0	8.3	10.6	43.9	-	16.9	17.4
AdcD	4.8	6.8	6.2	6.8	7.0	5.2	7.7	8.2	-	15.3
AdcE	5.5	6.2	4.0	4.6	5.4	6.2	7.0	8.6	6.8	-
IDENTITES (%)										

Tableau VII : Matrice d'identités/homologies entre AdcA-E de Dictyostelium, les arrestines humaines Arr β 1 et ArrS, l'arrestine de levure PalF et les protéines à domaine arrestine humaines Adc1 et VDUP. Pour le calcul des identités/homologies, les séquences des protéines de Dictyostelium ont été limitées au cœur arrestine.

L'analyse des séquences à l'aide des logiciels de recherche de motifs protéiques Pfam et SMART (<http://pfam.sanger.ac.uk/> et <http://smart.embl-heidelberg.de/>, respectivement) a permis de mettre en évidence la présence de différents domaines d'interaction de type protéine-protéine ou protéine-lipide de part et d'autre du cœur arrestine (Figure 15) :

- Les protéines AdcA et D comportent toutes les deux, en aval du cœur arrestine, un domaine FYVE décrit par ailleurs pour son rôle dans la liaison au PI(3)P. Ces deux protéines diffèrent néanmoins par leur longueur (580 acides aminés pour AdcA contre 785 acides aminés pour AdcD) et par leurs séquences qui ne sont que très faiblement conservées en dehors du domaine FYVE. La caractérisation fonctionnelle d'AdcA a fait l'objet de ce travail de thèse et son organisation structurale est présentée plus en détail dans la partie II.
- Les protéines AdcB (617 acides aminés) et C (654 acides aminés) présentent une architecture proche avec une identité supérieure à 40 %. Elles possèdent chacune, en plus du cœur arrestine, un domaine de type C2 (domaine de ciblage aux phospholipides dépendant du calcium, PF00168) en N-terminal et un domaine SAM (Sterile Alpha Motif, PF00536. Module d'homo- et d'hétéro-oligomérisation avec d'autres domaines SAM) à l'extrémité C-terminale. Si ces

deux protéines sont exprimées dans la même phase du cycle, il est probable que leur rôle est redondant.

- La protéine AdcE (564 acides aminés) possède plusieurs domaines d'interaction protéique avec deux domaines MIT (**M**icrotubule **I**nteracting and **T**ransport domain, PF04212. Lie en particulier les substrats du complexe ESCRT III) et un doigt de zinc de type LIM (présent dans les protéines **L**in-11, **I**sl-1 et **M**ec-3, PF00412. Domaine d'interaction protéine-protéine) en amont du domaine C-arrestine. Le domaine N-arrestine n'est pas identifié par les logiciels de prédiction.
- AdcF, la plus longue protéine des Adcs (1030 acides aminés), a, en amont du cœur arrestine, une très longue extension sans homologies avec des protéines connues chez *Dictyostelium* ou chez d'autres organismes.

PARTIE II. CARACTERISATION DE LA PROTEINE ADCA

I. AdcA est une protéine multimodulaire

Le gène *adcA* (numéro d'accèsion DDB_G0292924) est situé sur le chromosome 6 (position 2277184 à 2279014). Il a une longueur de 1831 pb et comporte un intron unique de 88 pb situé en position 661 (Figure 16A). Le gène *Dd-adcA* code pour une protéine de 580 acides aminés dont la masse moléculaire calculée et le pI théorique sont respectivement de 64,5 kDa et de 8,84. La protéine AdcA, identifiée sur la base de la présence du module arrestine, contient par ailleurs plusieurs domaines supplémentaires qui étendent la protéine en N-terminal et en C-terminal (Figure 16B).

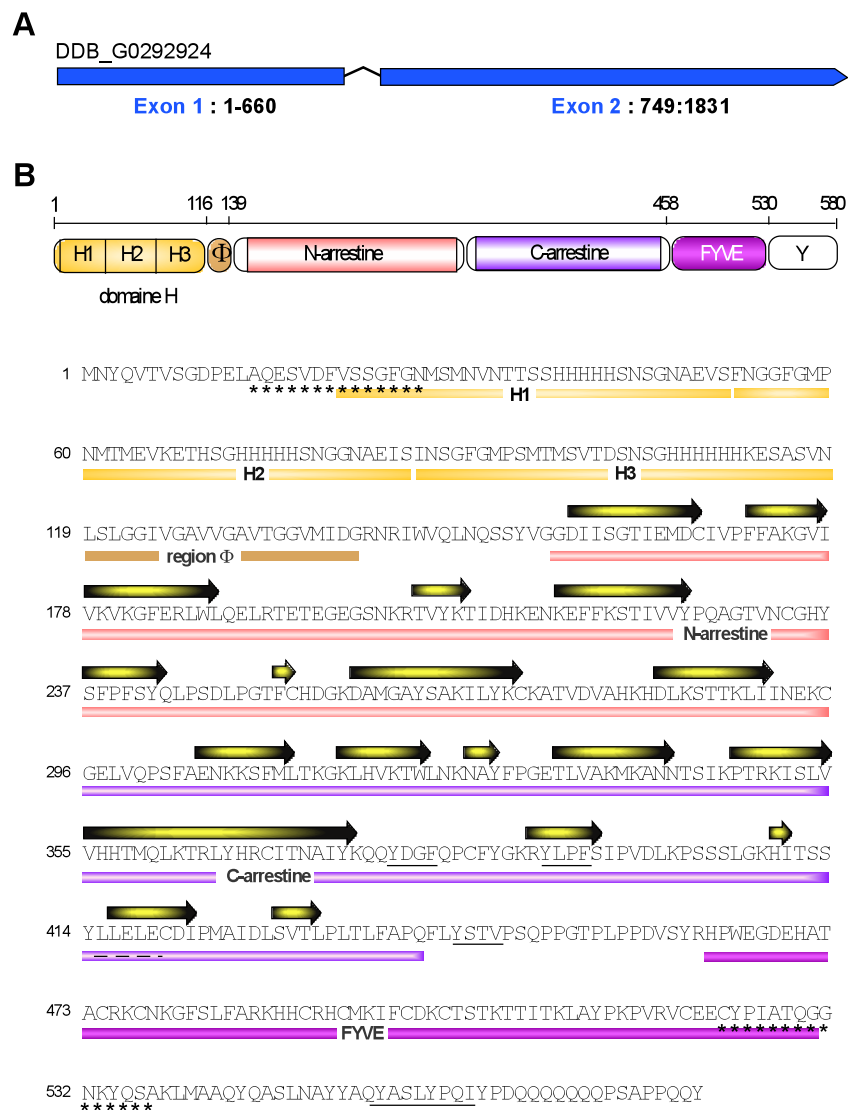


Figure 16 : Séquence nucléique et protéique et prédiction de la structure secondaire de AdcA. A, Les 2 exons qui représentent la séquence codante de *AdcA* sont représentés en bleu. B, La structure protéique de *AdcA* est représentée de façon schématique en domaines : en jaune le domaine H ; en brun le domaine Φ ; en rose et violet, les domaines N- et C-arrestine ; en pourpre le domaine FYVE. La prédiction en feuillets beta est indiquée par les flèches jaunes et noires au-dessus de la séquence protéique. Les peptides utilisés pour la production de l'anticorps polyclonal sont soulignés par des étoiles. Les sites potentiels d'interaction avec l'adaptine AP2 de type Yxx Φ et avec la clathrine sont soulignés par un trait continu ou pointillé, respectivement.

A. Le module arrestine

Le cœur arrestine (acides aminés 146 à 441) qui inclut les deux domaines arrestine-N et arrestine-C, occupe une position centrale (Figure 16). L'utilisation du logiciel PSIPred de prédiction de structures secondaires (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) prédit une organisation très majoritairement en feuillets β conformément à la structure des arrestines canoniques (Figure 16).

Le cœur arrestine a pu être modélisé à partir de la structure résolue de l'arrestine visuelle de bœuf (Han *et al.*, 2001) à l'aide du logiciel PHYRE (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) et visualisée avec le logiciel PyMOL (Figure 17). Le module arrestine de AdcA s'organise en deux domaines, chacun étant formé d'un sandwich incurvé de deux feuillets β antiparallèles.

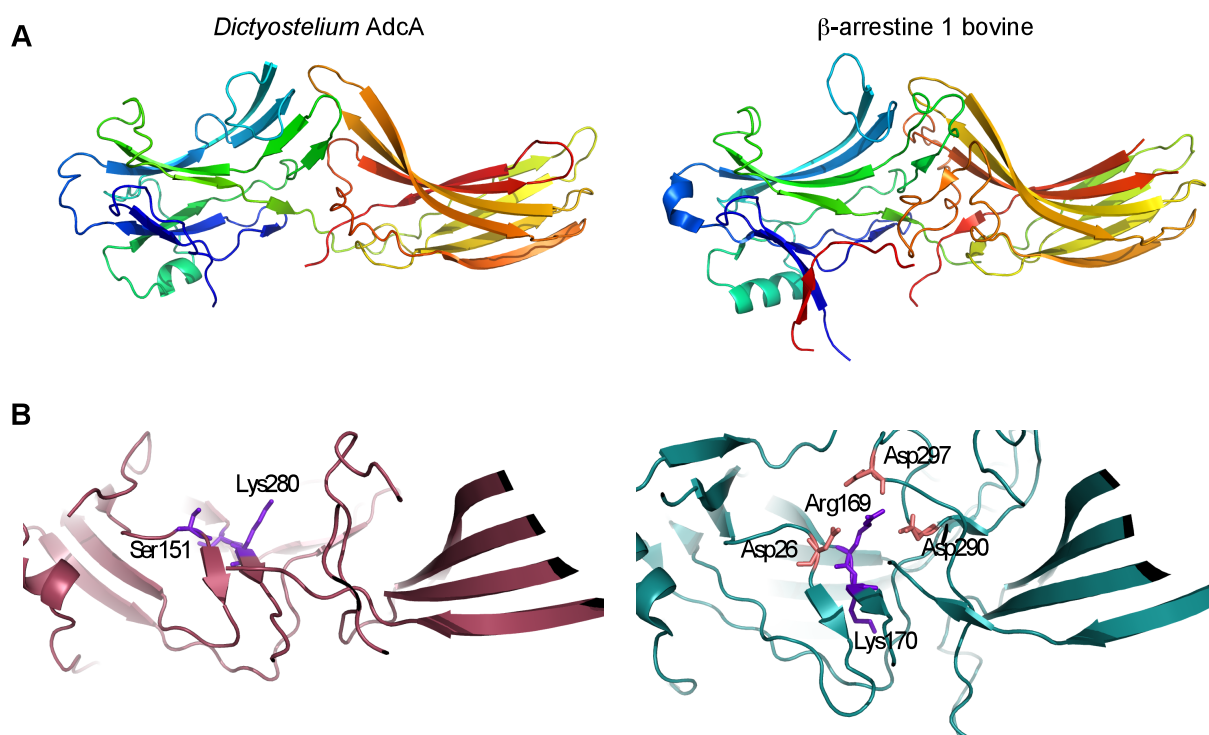


Figure 17 : Structure de la protéine AdcA modélisée à partir de la structure cristallographique de la β -arrestine 1 de bœuf. **A.** Les structures tridimensionnelles du cœur arrestine de AdcA et de la β -arrestine 1 de bœuf (2WTR) sont visualisées avec le logiciel PyMol. **B.** Le cœur polaire de la β -arrestine 1 de bœuf et la région équivalente de AdcA sont agrandies pour montrer l'absence de cœur polaire dans AdcA.

Les arrestines canoniques possèdent un cœur polaire dont la stabilité est affectée suite à la liaison d'un récepteur cible phosphorylé. Cette déstabilisation temporaire due à l'introduction de charges négatives au sein du cœur polaire conduit à l'exposition de la queue C-terminale

des arrestines et permet, dans le cas des β -arrestines, l'accessibilité des sites de liaison à la clathrine et à l'adaptine AP2 portés par la queue C-terminale. La structure de AdcA modélisée par homologie suggère l'absence d'un tel cœur polaire, tout du moins dans une région similaire de la protéine (Figure 17B). Compte tenu du fait que AdcA se prolonge en C-terminal par un domaine plus long et sans homologie avec la queue C-terminale des arrestines de mammifères, il est raisonnable d'envisager un mode de fonctionnement différent. Le cœur arrestine de AdcA présente toutefois un site putatif d'interaction à la clathrine ($^{415}\text{LLELE}^{419}$) et plusieurs sites d'interaction avec la chaîne μ des adaptines de type Yxx Φ (avec x un acide aminé quelconque et Φ un acide aminé hydrophobe) sont présents sur la protéine (Figure 16B).

B. Le domaine H

L'extrémité N-terminale (acides aminés 18 à 111) de AdcA est constituée d'une région riche en histidines que nous avons appelé « domaine H ». Le domaine H est constitué d'une répétition de trois sous-domaines d'environ 34 acides aminés qui partagent 80% d'identité entre eux et contiennent chacun un groupe de 5 ou 6 histidines consécutives (Figure 18A). Les séquences entre 2 groupes d'histidines sont prédites en brins β et cette séquence pourrait être organisée en trépied présentant les 3 boucles d'histidines dans un même plan (Figure 18B).

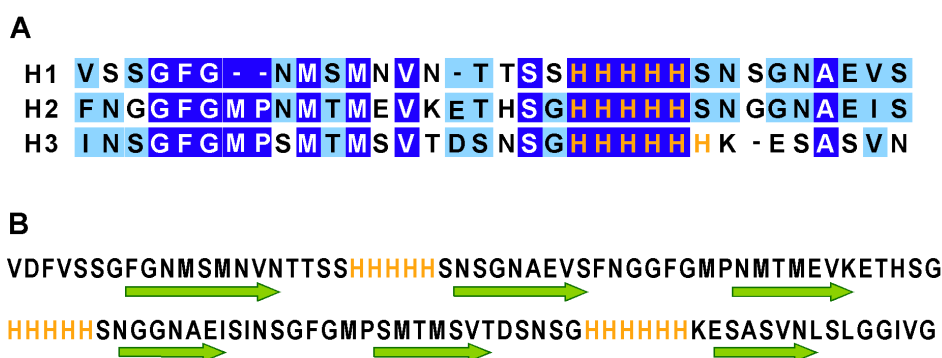


Figure 18 : Représentation schématique de l'organisation du domaine H. A. Le domaine H est formé de 3 sous-domaines fortement homologues contenant 3 clusters de 5 à 6 histidines (orange). B. Les clusters d'histidines (orange) sont séparés par des séquences en brins β (flèches vertes).

Les groupes d'histidines présents dans AdcA représentent une occurrence naturelle de l'étiquette poly-histidine utilisée pour purifier des protéines recombinantes et suggèrent fortement la possibilité d'une liaison physiologique de cette région à des métaux de transition.

C. Le domaine ϕ

Ce domaine H est jouté, du côté C-terminal, par une séquence hydrophobe riche en glycines que nous avons appelé ϕ (acides aminés 119 à 138). La prédiction de structure secondaire donnée par TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk>) suggère que cette séquence représente un passage transmembranaire en hélice α (Figure 19A). Le logiciel HeliQuest (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>) prédit que l'hélice est amphipathique avec une face hydrophobe mettant en jeu les acides aminés AIGVLVVVV (Figure 19B).

Une conformation avec une face très hydrophobe pourrait représenter un site d'interaction avec des membranes ou des régions hydrophobes (hélice transmembranaire). L'hélice amphipathique prédite contient de nombreuses glycines, réputées défavorables à la constitution d'une hélice. De telles hélices riches en glycines existent cependant, et les faces qui contiennent les glycines sont des faces de contact entre plusieurs hélices appartenant à des homopolymères, par exemple (Javadpour *et al.*, 1999).

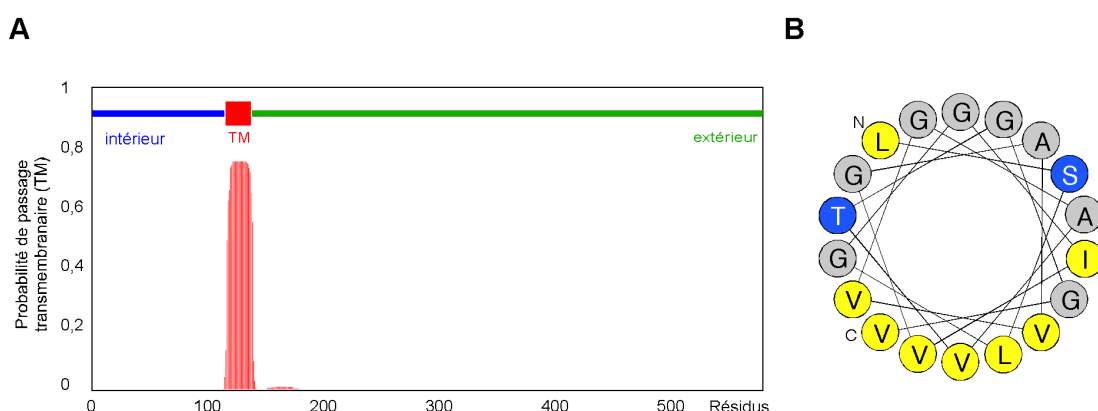


Figure 19 : Représentation schématique de l'organisation du domaine ϕ . A. Le domaine ϕ (aa. 119 à 138) est hydrophobe. La probabilité de passage transmembranaire est forte, de l'ordre de 0,8. B. Le domaine hydrophobe ϕ est prédit en hélice amphipathique transmembranaire. En gris sont représentés les résidus non chargés, en bleu les résidus hydrophiles et en jaune les résidus hydrophobes.

D. Le domaine FYVE

En aval du domaine arrestine, AdcA présente un domaine FYVE (acides aminés 463 à 530) qui partage environ 42 % (52 %) d'identité (d'homologie) avec celui de la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen) humaine qui intervient dans la fusion des membranes des endosomes, et environ 41 % (49 %) d'identité (d'homologie) avec la protéine endocytaire SARA (Smad Anchor Receptor Activation) qui permet l'interaction entre un récepteur et un médiateur de la signalisation en aval au niveau des endosomes précoces (Figure 20, A et B).

A

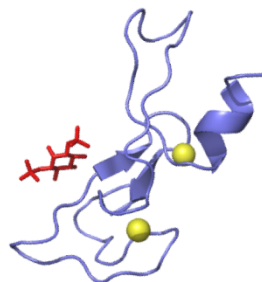
	Identité (%)	Homologie (%)
Endofin	39,0	47,5
SARA	40,7	49,2
RUFY1	49,2	64,4
EEA1	42,4	52,5
ALFY1	44,1	62,7
Hrs	45,8	54,2
Myotubularin related	39,0	52,5
PIKfyve	33,9	50,8

Figure 20 : Domaine FYVE de AdcA. A. Pourcentages d'identité et d'homologie entre les domaines FYVE de AdcA et des protéines humaines Endofine, SARA, RUFY1, EEA1, ALFY1, Hrs, une protéine apparentée à la myotubularine et PIKfyve. B. Alignement du domaine FYVE de AdcA avec celui de ces mêmes protéines. C-D. Modélisation de la structure du domaine FYVE de AdcA (C) sur la structure cristalline du domaine FYVE d'EEA1 (D). Les sphères jaunes correspondent aux ions zinc liés et la molécule de PI(3)P est représentée en rouge.

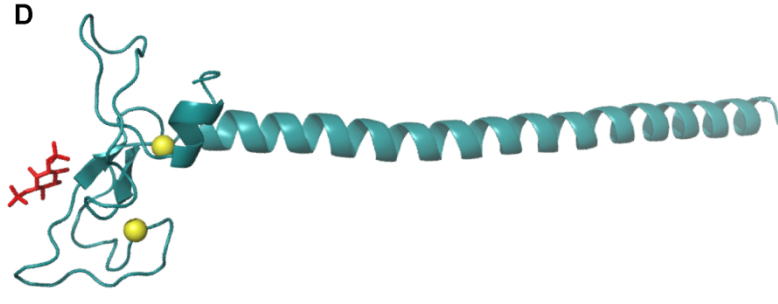
B

						10														20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								</
--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

C



D



Ce domaine est également retrouvé chez la kinase PIKFyve et les phosphatases de type myotubularines spécifiques des phosphoinositol phospholipides, RUFY1, un effecteur de Rab4, ALFY, une protéine de l'autophagie ou encore Hrs, une protéine du complexe de tri ESCRT (Figure 20, A et B). Les résidus conservés représentent la signature des domaines FYVE. Elle est composée de 2 parties : 4 paires de cystéines participent deux à deux à la liaison de 2 atomes de zinc et les motifs WxxD, RKHHCR, RVC constituent une plateforme basique qui permet la liaison spécifique du PI(3)P, un phosphoinositide particulier enrichi sur la voie endocytaire. La structure tridimensionnelle du domaine FYVE de AdcA (Figure 20C) peut être modélisée à partir de la structure cristalline obtenue avec le domaine FYVE d'EEA1 (Figure 20D). Le domaine FYVE de AdcA diffère cependant par l'absence de l'hélice α visible dans la structure de FYVE-EEA1 et qui permet sa dimérisation fonctionnelle.

E. Le domaine Y

A l'extrémité C-terminale de AdcA se trouve une zone très riche en tyrosines (domaine Y entre les acides aminés 533 à 580, 8 tyrosines/47 acides aminés). Cette région contient deux sites putatifs d'interaction à la chaîne μ de l'adaptine AP2 (YASL en position 555 et YPQI en position 559) et deux sites putatifs d'interaction avec la protéine Tsg101 (PSQP en position 447 et PSAP en position 573).

II. Des homologues de AdcA existent chez d'autres amibes et le phytoplancton

La protéine AdcA diverge des arrestines α et β par la présence de ses domaines supplémentaires, en particulier le domaine FYVE. Une recherche avec BlastP a été réalisée avec la séquence de AdcA entière pour repérer des homologues de AdcA chez d'autres espèces (Figure 21). Un homologue de AdcA est retrouvé chez deux autres Dictyostélides, *D. purpureum* et *Polysphondylium pallidum*. Alors que la protéine de *P. pallidum* ne possède pas les clusters riches en histidines, celle de *D. purpureum* se démarque par la présence de 4 répétitions. Une autre espèce d'amibe, *Entamoeba histolytica* possède une protéine apparentée à AdcA. De façon surprenante, un homologue de AdcA est également retrouvé chez deux espèces de picophytoplancton, *Micromonas pusilla*.

D. discoideum	1	M-NQAVT VSGDF ELAQESVD F	77	VSSGDF - NMNMVNTT SSSHHHNSGAAE SFGNGFGMPNMTMEVET HSGHHHS	166
D. purpureum	1	MSRQVAK EEDPFLAMDA G FGGPNNITVT ESHHHHHHNSSEVSTNGFGMP SMTMEVET HGHHHHNSN- TA EVSFNNGFG- P SMTMEVET HGHHS	100	ASINVA	182
M. pusilla	1	M-DRKVT VKDFPHLAKNEA- F	32		
Microtrichs R0C299					
E. histolytica					
D. discoideum	78	NGGNAE I S I NSGF GMP SMTA SVT DSN SGGHHHHK ESA SVNL STGGI VGVAV	166	NGSSTVGGG I I SGT I -	END
D. purpureum	101	HHNSGNAEVSFNNSNT GMP SMTA SVS SDS - HHGTVYGGAGVDNLGGVAANVAASVVGAVGQALV I D I RNR IWO L - NQASV IGGVAVSGTV -	182	END	
P. pallidum	33	NGTT SAVNNMNV -	83	NGSSTVGGG I I SGT I -	END
M. pusilla	31	NGTT SAVNNMNV -	83	NGSSTVGGG I I SGT I -	END
Microtrichs R0C299	1	MAADPFAFVPS -	79	MAADPFAFVPS -	43
E. histolytica					
D. discoideum	167	C V P FFAKGV I KVKGFERWLQELRT	224	ETEEGSKNRTVYKT I DHKENKEF -	KST I IV
D. purpureum	196	C V P FFAKGV I KVKGFERWLQELRT	225	ETEEGSKNRTVYKT I DHKENKEF -	KST I IV
P. pallidum	93	C V P FFAKGV I KVKGFERWLQELRT	156	ETEEGSKNRTVYKT I DHKENKEF -	RST I CV
M. pusilla	96	C V P FFAKGV I KVKGFERWLQELRT	156	ETEEGSKNRTVYKT I DHKENKEF -	RST I CV
Microtrichs R0C299	44	HMRY ESVL L SVCTTSRTITDKM	82		
E. histolytica					
D. discoideum	225	Y P - - - - - OAGTVNGHYSSEFFSYOLPDLGTFCHDGD- AMF AYSAKI LYKATV	292	DVAHKHD -	KST I K I I N
D. purpureum	254	Y P - - - - - OSGVNSGHYSSEFFSYOLPDLGTFCHDGD- ENG AYSAKI LYKATV	321	DVAHKHD -	KFT SK I V I N
P. pallidum	151	Y P - - - - - HOGVNP GHYSSEFFSYOLPDLGTFCHDGD- AOG AYSAKI LYKATV	218	DVAHKHD -	TGEEK I IAA
M. pusilla	186	Y P - - - - - HOGVNP GHYSSEFFSYOLPDLGTFCHDGD- AOG AYSAKI LYKATV	275	DVAHKHD -	TGEEK I IAA
Microtrichs R0C299	162	Y P - - - - - SGGDIPAGTTHHEEAVI PRAASA TVAGSNVSHKQLEI ELYTAAVAAADEP SGANGGSDG- STGGPAPSVS -	148		
E. histolytica	63	Y P - - - - - E-MNHEMNQNPFLSTSLGTS- LTOEESVLS- NSITSQLFKINAH-			
D. discoideum	293	ECGELY -	331	OPFAENKSEML KKKLHVKTWKNKNAVPG	
D. purpureum	322	ECGELY -	360	OPFAENKSEML KKKLHVKTWKNKNAVPG	
P. pallidum	219	ECGELY -	257	OPFAENKSEML KKKLHVKTWKNKNAVPG	
M. pusilla	265	ECGELY -	357	OPFAENKSEML KKKLHVKTWKNKNAVPG	
Microtrichs R0C299	149	ECGELY -	189	OPFAENKSEML KKKLHVKTWKNKNAVPG	
E. histolytica					
D. discoideum	332	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	428	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	457
D. purpureum	361	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	457	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	457
P. pallidum	258	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	354	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	454
M. pusilla	358	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	795	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	264
Microtrichs R0C299	190	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	264	ETLVAKKAKNNTSIKPTKSLVVFHMKF KTRLYHRCITNAIYK	264
E. histolytica					
D. discoideum	429	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	504	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	504
D. purpureum	458	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	533	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	533
P. pallidum	355	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	430	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	534
M. pusilla	455	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	562	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	562
Microtrichs R0C299	285	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	369	SVTLFLTLFAPQFLKSTVPSQPPGT	369
E. histolytica					
D. discoideum	505	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	590	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	590
D. purpureum	534	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	599	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	599
P. pallidum	431	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	502	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	502
M. pusilla	555	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	641	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	641
Microtrichs R0C299	370	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	648	KTTITKLAAPKRYAEFFVPSGQKYSKAKLMAQ - - - - -	648
E. histolytica					
D. discoideum	642	TLPT-S-	647	TLPT-S-	647
D. purpureum	649	NLDGGDGDTPGVDAVSGSAAAGGAGNHGGGGGAGNAGGAGVTPPATITAEIR	706	NLDGGDGDTPGVDAVSGSAAAGGAGNHGGGGGAGNAGGAGVTPPATITAEIR	706
P. pallidum					
M. pusilla					
Microtrichs R0C299					
E. histolytica					

Figure 21 : Occurrence d'homologues de AdcA chez d'autres espèces. La séquence entière de AdcA a été utilisée pour rechercher des homologues à l'aide du logiciel BlastP. Ont été retenues les séquences ayant un cœur arrestine reconnaissable par la séquence et la structure en brins β (flèches jaunes) et un domaine FYVE (souligné en violet) porteur de la signature du domaine. Cinq séquences supplémentaires ont été alignées avec la séquence de AdcA. Une conservation supérieure à 80% pour une position est indiquée par un fond bleu foncé. La couleur du fond s'éclaircit progressivement quand la conservation passe à 66 ou 50%.

Micromonas est considéré comme l'ancêtre de la lignée des plantes vertes. Cela pourrait indiquer la présence d'un homologue de AdcA chez les plantes vertes dont le cœur arrestine est trop éloigné en séquence pour être repéré à l'aide d'une recherche BlastP.

III. Répartition des homologues d'Adc chez d'autres espèces

La présence d'homologues de AdcA chez d'autres genres d'amibes parmi les Amoebozoaires et chez le plancton nous a encouragé à faire une recherche d'homologues pour l'ensemble des protéines Adc de *D. discoideum*. Les résultats, regroupés dans l'arbre phylogénique de la Figure 22, indiquent que, mis à part AdcA, les homologues d'Adc ne sont retrouvés que chez les Amoebozoaires : *D. purpureum*, *P. pallidum*, *E. histolytica*, *E. dispar*.

Deux degrés de variations supplémentaires sont observés :

- 1) alors que le domaine C2 est positionné du côté N-terminal du cœur arrestine chez les Dictyostélides, il est du côté C-terminal du cœur arrestine chez les Entamoebidés.
- 2) une association du cœur arrestine avec d'autres domaines que FYVE, C2, MIT, LIM est observée chez les Entamoebidés (domaines WW et autres).

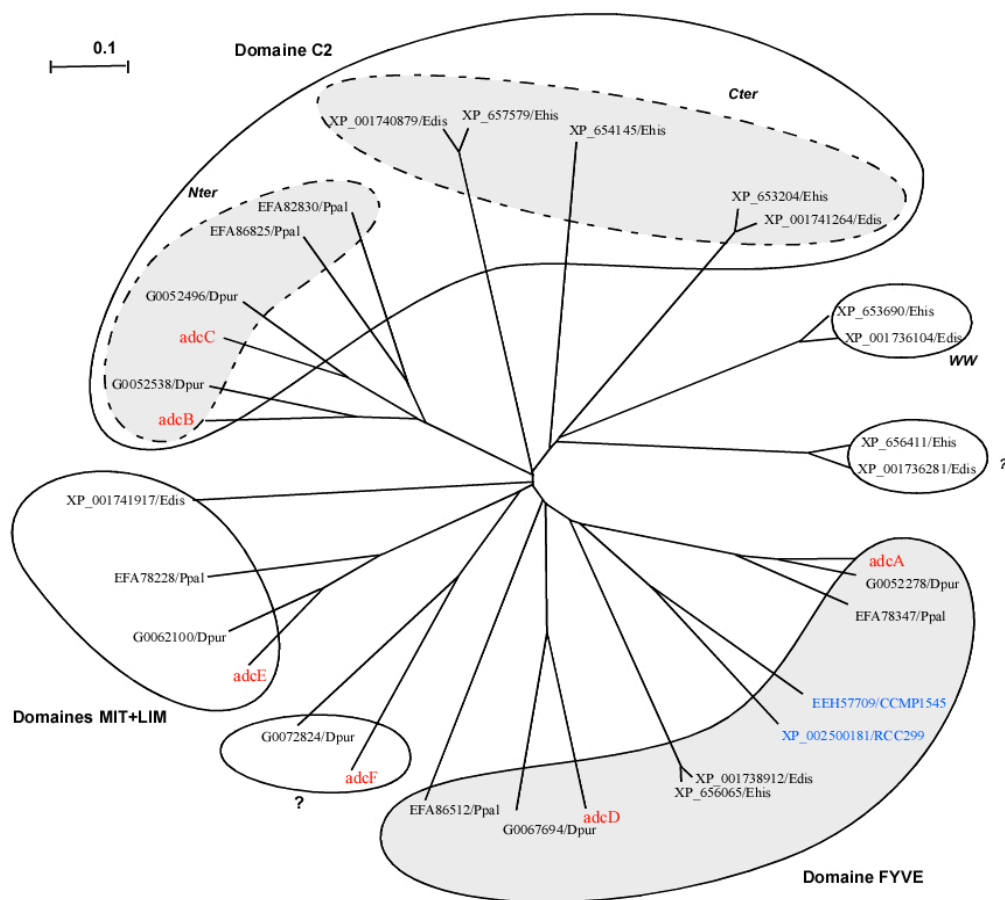


Figure 22 : Occurrence d'homologues des AdcA-F. Les séquences entières de AdcA-F ont été utilisées pour une recherche d'homologues à l'aide du logiciel BlastP. Les différentes séquences ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW et l'arbre phylogénique qui en dérive visualisé à l'aide du logiciel TreeView. Les séquences en rouge correspondent à *D. discoideum* et celles en bleu à *Micromonas*. Dpur, *D. purpureum* ; Ppal, *P. pallidum* ; Ehis, *E. histolytica* ; Edis, *E. dispar* ; RCC299, *M. pusilla* RCC299 ; CCMP1545, *Micromonas* sp. CCMP1545.

IV. Développement d'outils pour l'étude de AdcA

A. Production d'anticorps anti-AdcA

Afin de faciliter l'étude de AdcA pour laquelle aucun anticorps commercial n'est disponible, nous avons développé des anticorps polyclonaux spécifiques chez le lapin et chez le cobaye.

- *Anticorps AcL-AdcA* : deux peptides, l'un dans la partie N-terminale (¹⁴AQESVDFVSSGFGN²⁷), l'autre dans l'extrémité C-terminale (⁵²³CYPIATQGGNKYQSAK⁵³⁷) ont été utilisés comme immunogène chez le lapin.

- *Anticorps AcC-AdcA* : le domaine H de AdcA a été exprimé en bactéries BL21-DE3 sans étiquette exogène (voir page 100) et purifié sur colonne de Ni-NTA sous forme native. Ce fragment a été utilisé pour générer des anticorps chez le cobaye.

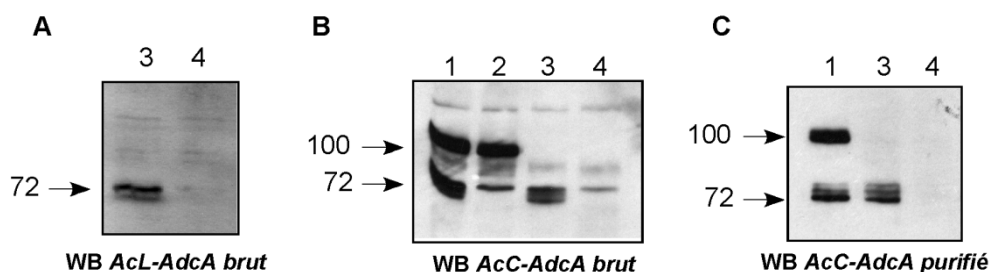


Figure 23 : Validation des anticorps anti-AdcA. Des extraits cellulaires totaux de différentes souches sont analysés par Western blot avec les anticorps anti-AdcA générés chez le lapin et chez le cobaye. Les puits correspondent à : 1 = KAX-3 surexprimant AdcA_{GFP} ; 2 = adcA nulle surexprimant AdcA_{GFP} ; 3 = KAX-3 ; 4 = adcA nulle. Les bandes à une taille de 100 kDa et 72 kDa correspondent à la protéine AdcA_{GFP} et AdcA endogène, respectivement. **A.** Anticorps de lapin AcL-AdcA avant purification. **B.** Anticorps de cobaye AcC-AdcA avant purification. **C.** Anticorps AcC-AdcA après purification.

Au terme du protocole d'immunisation (société Covalab), les sérums obtenus ont été testés par Western blot sur des extraits protéiques totaux issus de la souche parentale et de mutants invalidés pour *adcA* (voir page 110, III-I) afin de s'assurer de leur spécificité. Comme illustré sur la Figure 23, les deux sérums bruts reconnaissent une protéine aux environs de 70 kDa (taille attendue de AdcA) dans la souche parentale qui est absente dans les mutants nuls. Dans les surexpresseurs KAX-3 AdcA_{GFP}, les anticorps reconnaissent également une protéine à 100 kDa (taille attendue pour AdcA_{GFP}), absente dans la souche parentale KAX-3. Du fait de la réaction croisée avec un certain nombre de protéines non relevantes, les anticorps anti-AdcA ont été purifiés par chromatographie d'affinité. L'anticorps *AcL-AdcA* a été purifié successivement sur chacun des peptides greffés sur des billes d'agarose et la purification (Harlow and Lane, 1988) indique qu'il est majoritairement dirigé contre le peptide ¹⁴AQESVDFVSSGFGN²⁷. L'anticorps *AcC-AdcA* a été purifié sur le domaine H exprimé dans les bactéries BL21-DE3 sous forme fusionnée à la GST en N-terminal et immobilisé sur colonne de glutathion-Sepharose. L'anticorps *AcL-AdcA* s'est révélé être instable après un cycle de congélation-décongélation. Pour cette raison, l'anticorps *AcC-AdcA* a été utilisé de façon préférentielle dans la suite des travaux.

B. Expression de protéines étiquetées

Différentes constructions de surexpression de AdcA ont été générées, étiquetées avec une protéine fluorescente GFP ou RFP ou encore l'épitope myc₂. Ces constructions correspondent, soit à la forme entière de AdcA, soit à des formes tronquées ou portant des mutations ponctuelles. Elles ont été exprimées chez *Dictyostelium* de façon constitutive sous le contrôle du promoteur p*Actine15* dans le vecteur pExp4⁺ sauf quand mentionné autrement. Certains sous-domaines ont été exprimés en bactéries BL21-DE3 avec ou sans étiquette en vue de leur caractérisation biochimique. Le Tableau VIII récapitule l'ensemble des constructions qui ont été utilisées au cours de ce travail de thèse.

Construction	Limites en AA	Vecteur	Etiquette	Position
Expression dans <i>Dictyostelium</i>				
AdcA _{GFP}	1-580	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
_{RFP} AdcA	1-580	pDEXRH	RFP	N-ter
AdcA _{myc2}	1-580	pExp4 ⁺	myc ₂	C-ter
AdcA ^{R491A} _{GFP}	1-580	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
AdcAΔFYVE _{GFP}	1-580Δ461-530	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
AdcAΔFY _{GFP}	1-459	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
AdcAΔHΦ _{GFP}	140-580	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
AdcAΔHΦ _{myc2}	140-580	pExp4 ⁺	myc ₂	C-ter
AdcA-NC _{GFP}	146-441	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
HΦ _{GFP}	1-156	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
_{GFP} FY	458-580	pExp4 ⁺	GFP	N-ter
_{GFP} FYVE	458-530	pExp4 ⁺	GFP	N-ter ou C-ter
2x(FYVE) _{GFP}	458-530	pExp4 ⁺	GFP	C-ter
Expression en bactéries				
_{GST} AdcA _C	311-459	pGEX-KG	GST	N-ter
_{MBP} FYVE	458-530	pMAL-C2	MBP	N-ter
H	1-116	pETduet1	-	-

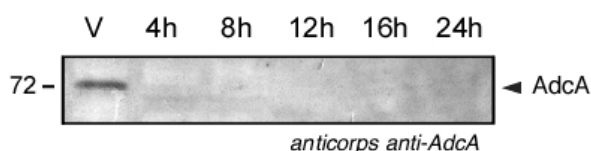
Tableau VIII : Liste des constructions utilisées dans ce travail

C. Expression temporelle de AdcA

L'amibe *Dictyostelium* présente un cycle végétatif qui représente une phase de multiplication unicellulaire quand la nourriture est abondante et un cycle social de développement multicellulaire en situation de carence (voir Figure 14). Le profil d'expression temporelle de AdcA pendant la phase végétative et le cycle de développement a été déterminé par Western blot sur des extraits cellulaires totaux réalisés à différents stades.

Le Western blot obtenu à l'aide de l'anticorps *AcL-AdcA* (Figure 24) montre que AdcA est exprimée pendant la phase végétative unicellulaire et que son niveau diminue rapidement alors que l'organisme s'engage dans le programme de développement. Ce résultat nous a amenés à étudier AdcA plus spécifiquement dans le contexte végétatif.

Figure 24 : Expression de AdcA au cours du développement. Western blot réalisé avec l'anticorps anti-AdcA *AcL-AdcA* (sur des extraits totaux de cellules en phase végétative (V) et aux différents stades du développement (entre 4 et 24 heures).



V. Localisation subcellulaire de la protéine AdcA

Afin d'approcher le rôle de AdcA, nous nous sommes intéressés à sa distribution subcellulaire par différentes approches.

A. AdcA est associée à une fraction membranaire

Une première indication a été obtenue par fractionnement subcellulaire. Les cellules surexprimant AdcA_{GFP} ou AdcA_{myc} ont été cassées et la fraction soluble séparée de la fraction membranaire par une centrifugation à haute vitesse (100 000 x g). La distribution de AdcA dans ces différentes fractions a été suivie par Western blot. Lorsque les cellules sont cassées en tampon Mes à pH 6,5, la totalité de AdcA se retrouve dans la fraction membranaire (Figure 25A, B et C), soit parce que la protéine est intrinsèque avec un passage transmembranaire (voir Figure 19), soit parce qu'elle est simplement associée aux membranes. Cette alternative a été tranchée par un traitement au carbonate de sodium à pH très alcalin qui solubilise les protéines périphériques sans affecter les protéines membranaires. Le traitement de la fraction

membranaire fixant AdcA en tampon carbonate 100 mM à pH 11 conduit à une solubilisation totale de AdcA (Figure 25D). Ceci indique que AdcA n'est associée aux membranes que de façon périphérique et que la prédiction que le domaine Φ est un passage transmembranaire n'est pas vérifiée biochimiquement.

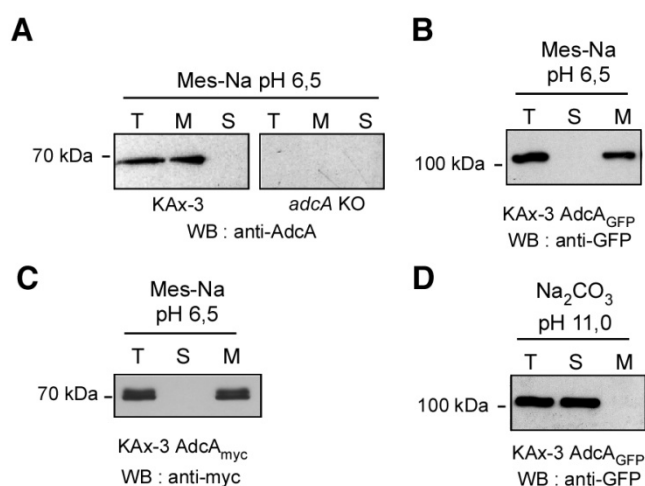


Figure 25 : Fractionnement subcellulaire de la protéine AdcA. A, B, C. Les cellules KAx-3 (A), KAx-3 AdcA_{GFP} (B) ou KAx-3 AdcA_{myc} (C) sont cassées dans un tampon de casse à pH 6,5, puis l'extrait est centrifugé à 100 000 x g pendant 1 heure pour séparer les protéines solubles (S) des protéines membranaires ou périphériques (M). **D.** La fraction membranaire obtenue de cellules KAx-3 AdcA_{GFP} est traitée par une solution de carbonate basique relâchant les protéines périphériques, puis centrifugée à haute vitesse pour séparer les protéines périphériques (S) et les protéines membranaires (M). La répartition de AdcA endogène ou des protéines étiquetées dans ces fractions est suivie par Western blot à l'aide d'anticorps anti-AdcA, anti-GFP ou anti-myc.

B. AdcA est associée à la voie endocytaire

Des expériences d'immunofluorescence ont permis d'affiner cette étude de localisation. L'observation de AdcA endogène dans la souche KAx-3 après marquage avec l'anticorps *AcC-AdcA* a mis en évidence la présence de AdcA sur le pourtour de nombreuses vésicules cytoplasmiques d'un diamètre de l'ordre du micromètre (Figure 26A). Un tel marquage n'est pas retrouvé dans le mutant *adcA* nul. En revanche, l'utilisation de ce même anticorps sur la souche *adcA* nulle montre un liseré membranaire plasmique comparable à celui observé dans la souche parentale, ce qui ne nous a pas permis de conclure quant à une éventuelle localisation de AdcA sur la membrane plasmique.

Un même marquage vésiculaire a été obtenu après immunomarquage avec un anticorps anti-myc de la souche KAx-3 AdcA_{myc} (Figure 26B) ou par observation directe de la souche surexprimant AdcA_{GFP} (KAx-3 AdcA_{GFP}) (Figure 26, C et D). Dans ces deux souches, la membrane plasmique est également légèrement marquée, ce qui suggère que AdcA est aussi présente à la membrane plasmique.

Les vésicules cytoplasmiques portant AdcA sont très similaires en taille aux compartiments de la voie macropinocytaire. Afin de confirmer la nature endosomale des vésicules AdcA-positives, les cellules KAx-3 AdcA_{GFP} ont été mises en présence d'un marqueur de phase fluide, le TRITC dextran (tetramethylrhodamine isothiocyanate dextran) pendant 2h afin de marquer la totalité des compartiments endocytaires puis observées en microscopie confocale. AdcA_{GFP} est retrouvée au niveau de vésicules qui sont toutes TRITC-dextran positives (Figure 26C), ce qui confirme leur caractère macropinocytaire. Cependant, certaines vésicules chargées en TRITC-dextran sont dépourvues d'un marquage par AdcA_{GFP}, ce qui indique que AdcA est présente de façon spécifique sur une sous-population de vésicules de la voie macropinocytaire.

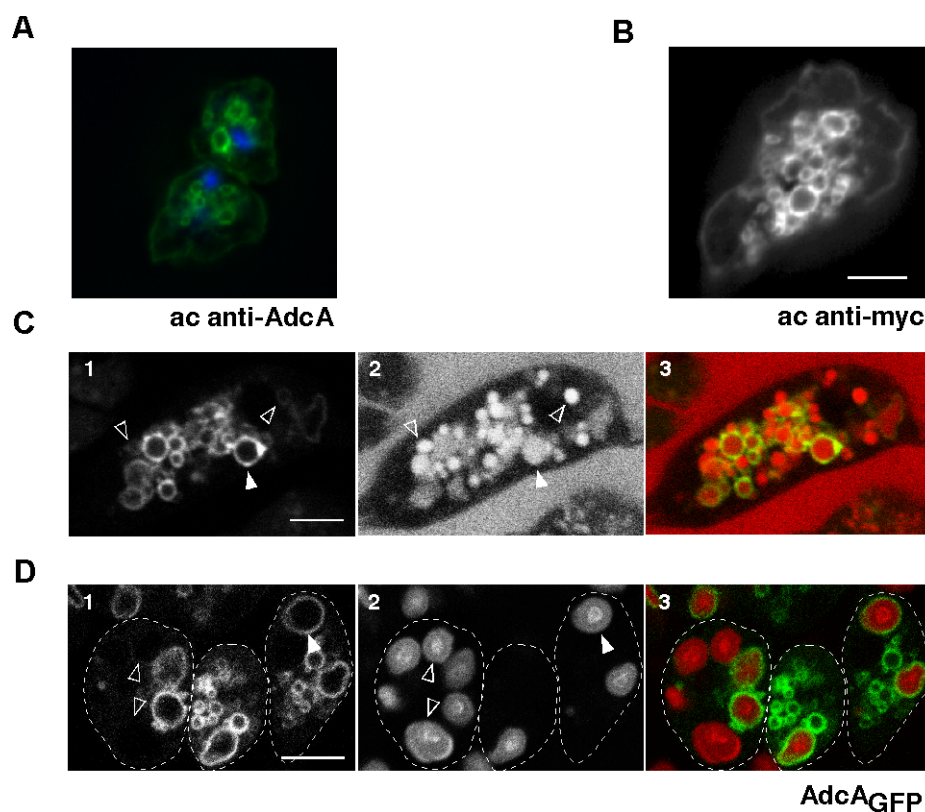


Figure 26 : Localisation endocytaire de AdcA. Observation de AdcA endogène (A) et de AdcA_{myc} (B). Des cellules de la souche parentale ou surexprimant AdcA_{myc} sont fixées et la présence de AdcA révélée à l'aide d'un anticorps anti-AdcA (A) ou anti-myc (B). Dans le panneau A, le noyau est coloré au DAPI. C. Des cellules KAx-3 AdcA_{GFP} sont mises en présence de TRITC dextran durant 2 h puis observées au microscope confocal. Les panneaux 1, 2 et 3 correspondent à AdcA_{GFP}, au TRITC-dextran et à la superposition des deux marquages, respectivement. D. Des cellules KAx-3 AdcA_{GFP} sont mises en présence de zymosan marqué au Texas-Red durant 2 h puis observées au microscope confocal. Les panneaux 1, 2 et 3 correspondent à AdcA_{GFP}, aux levures et à la superposition, respectivement. Barre d'échelle, 4 μ m.

Afin de déterminer si AdcA est spécifiquement recrutée sur la voie macropinocytaire ou si la protéine est également présente sur la voie phagocytaire, des particules de zymosan

(Texas Red-labeled zymosan BioParticles®, Molecular Probes) marquées au Texas-Red ont été ajoutées au milieu de culture pour marquer les compartiments phagocytaires. En 2 h, les amibes sont capables d'internaliser plus d'une dizaine de particules. Dans les cellules KAx-3 AdcA_{GFP} ayant phagocyté des particules, AdcA_{GFP} est aussi localisée au niveau de la membrane des phagosomes et, comme pour la voie macropinocytaire, AdcA est présente uniquement sur une sous-population de ces compartiments phagocytaires (Figure 26D).

C. AdcA est recrutée sur des compartiments précoces de la voie endocytaire

Les expériences précédentes montrent une spécificité de localisation de AdcA sur la voie endocytaire. Afin de déterminer plus précisément la nature des vésicules AdcA-positives, les différents compartiments de la voie endocytaire ont été marqués séquentiellement avec du TRITC-dextran par une approche de pulse-chasse. Un pulse de 5 min dans un milieu contenant 2 mg/ml de TRITC-dextran permet de marquer les endosomes. L'addition d'une période de chasse dans un milieu dépourvu de TRITC-dextran conduit à la progression du marqueur le long de la voie endocytaire et au marquage des lysosomes (après 15 min de chasse) puis des post-lysosomes (après 40 min de chasse) (Aubry *et al.*, 1993; Aubry *et al.*, 1997). La co-localisation de AdcA_{GFP} et du TRITC-dextran est suivie au cours de la chasse. L'absence de TRITC-dextran extracellulaire permet d'utiliser un microscope à épifluorescence classique.

Après une minute de chasse, AdcA_{GFP} est présente sur les vésicules chargées en TRITC-dextran (Figure 27). Lorsque la période de chasse est plus longue, le nombre de compartiments contenant du TRITC-dextran mais dépourvus de AdcA_{GFP} augmente progressivement jusqu'à une perte totale de co-localisation. AdcA_{GFP} est alors retrouvée sur des compartiments TRITC-dextran négatifs, vraisemblablement de nouveaux macropinosomes formés pendant la période de chasse et donc dépourvus de TRITC-dextran. Ces résultats mettent en évidence que AdcA est associée aux compartiments précoces de la voie endocytaire et que son temps de résidence y est relativement court.

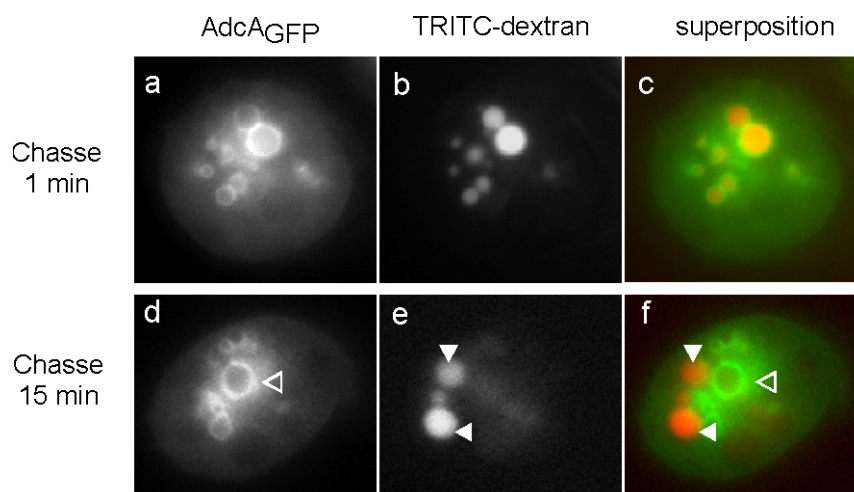


Figure 27 : Localisation de AdcA sur les endosomes précoces. Des amibes de la souche KAx-3 surexprimant AdcA_{GFP} sont mises en présence de TRITC-dextran à une concentration de 2 mg/mL pendant une période de 5 min (période de pulse), lavées extensivement en milieu glacé pour bloquer tout transit de matériel et remises en suspension dans du milieu frais dépourvu de marqueur de phase fluide (période de chasse). Les cellules surexprimant AdcA_{GFP} sont observées au microscope à épifluorescence à 1 min (a, b, c) ou 15 min (d, e, f) de chasse. Les panneaux a, b et c (d, e, f) correspondent à AdcA_{GFP}, au TRITC-dextran et à la superposition. Pendant la chasse de 15 min, le TRITC-dextran a progressé dans des endosomes tardifs dépourvus de AdcA (pointes de flèche pleines). Dans le même temps, de nouveaux macropinosomes précoces se sont formés, dépourvus de TRITC-dextran, mais positifs pour AdcA (pointe de flèche vide).

Afin d'affiner ces résultats, plusieurs marqueurs spécifiques des différents compartiments de la voie endocytaire ont été analysés pour leur co-localisation éventuelle avec AdcA. La protéine p80 (DDB_G0287297) est un transporteur de cuivre potentiel présent sur la totalité de la voie endocytaire avec un enrichissement important sur les post-lysosomes (Ravanel *et al.*, 2001). La vacuoline A (DDB_G0289485), l'homologue amibien de la flottiline (Wienke *et al.*, 2006), est principalement recrutée sur les post-lysosomes et a été utilisée, avec p80, comme marqueur de ces compartiments tardifs. La cathepsine D, une aspartyl protéase lysosomale (Journet *et al.*, 1999), a été utilisée comme marqueur des lysosomes. Les résultats obtenus (Figure 28) par immunomarquage avec des anticorps dirigés contre ces protéines montrent que AdcA ne colocalise ni avec la cathepsine D sur les lysosomes, ni avec p80 et la vacuoline sur les post-lysosomes et confirment l'absence de AdcA sur les compartiments tardifs de la voie endocytaire.

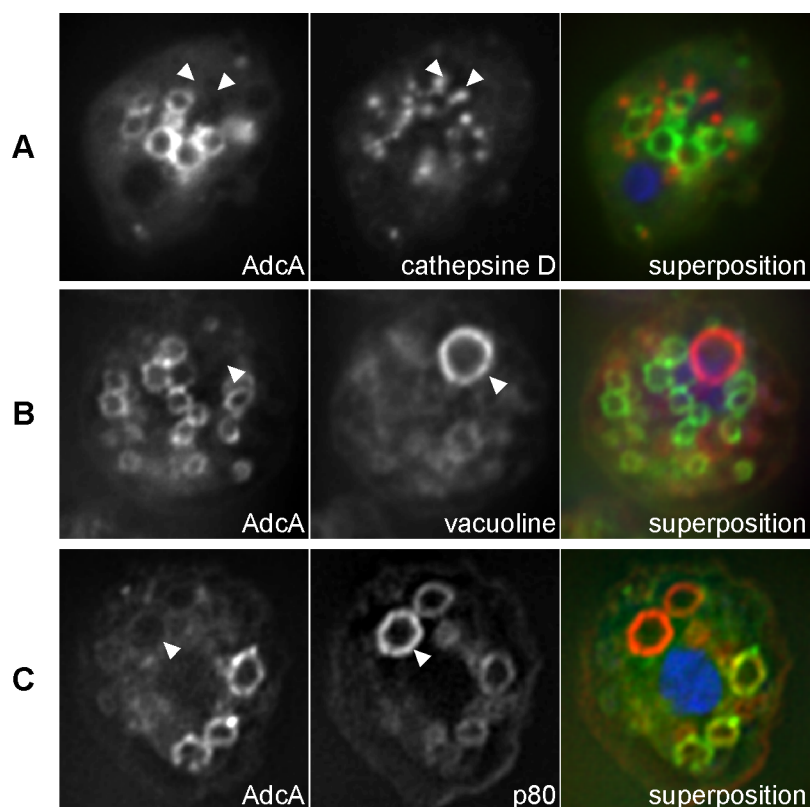


Figure 28 : AdcA est exclue des lysosomes et des post-lysosomes. Des cellules de la souche KAx-3 surexprimant AdcA_{GFP} sont fixées et marquées avec des anticorps polyclonaux anti-cathepsine D (A) ou monoclonaux anti-vacuoline (B) ou anti-p80 (C). Les panneaux de droite correspondent à la superposition des images de gauche de la même ligne.

Parallèlement, l'actine a été utilisée comme marqueur des étapes précoces afin de définir de façon temporelle l'étape d'enrichissement de AdcA sur la voie endocytaire. La formation des macropinosomes et phagosomes dépend de l'actine qui est nécessaire pour la formation des coupes macropinocytaires et phagocytaires. Le manteau d'actine est dépolymérisé dans la minute qui suit la fermeture de la vésicule et son détachement de la membrane plasmique. Les expériences d'immunofluorescence utilisant des anticorps anti-actine mettent en évidence la présence de AdcA sur des compartiments riches en actine proches de la membrane plasmique (Figure 29A, triangle blanc). La majorité des vésicules AdcA-positives néanmoins ne portent pas de revêtement d'actine (Figure 29A). Par ailleurs, alors que l'actine est déjà très enrichie sur la coupe macropinocytaire (Figure 29B, triangle blanc), AdcA_{GFP} ne décore que très faiblement cette coupe suggérant un enrichissement massif de AdcA après la fermeture des vésicules alors que les vésicules possèdent encore leur manteau d'actine.

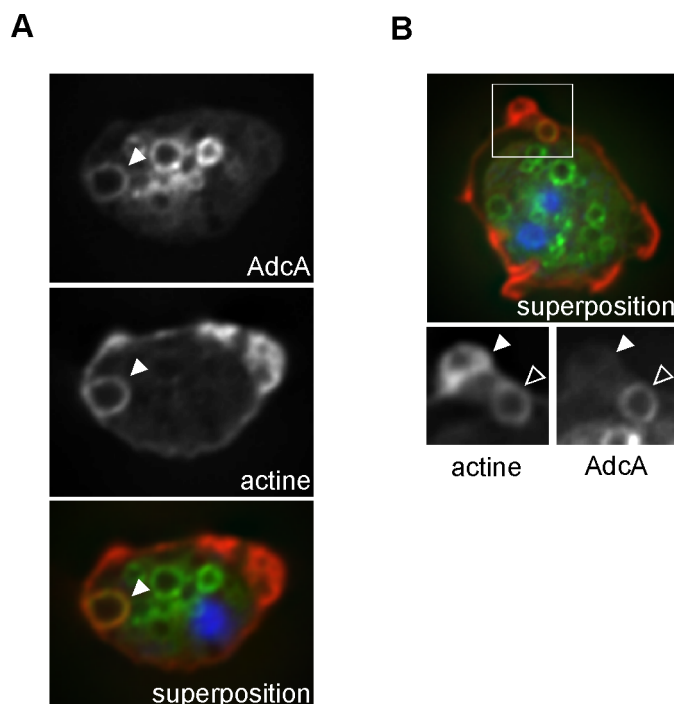


Figure 29 : AdcA est enrichie sur les endosomes dès leur fermeture. Des cellules de la souche KAx-3 surexprimant AdcA_{GFP} sont fixées et marquées avec un anticorps polyclonal anti-actine (A,B). **A.** macropinosome (triangle blanc). **B.** coupe macropinocytaire (triangle blanc) et macropinosome (triangle vide). Les noyaux sont marqués au DAPI.

D. La localisation endosomale de AdcA met en jeu le domaine FYVE de la protéine

Dans sa partie C-terminale, AdcA contient un domaine FYVE. Ce type de domaine a été identifié dans un certain nombre de protéines associées à la voie endocytaire comme EEA1, SARA, ou encore Hrs. Il participe directement à leur ciblage sur les endosomes en liant un lipide spécifiquement enrichi sur ces compartiments, le PI(3)P. Le motif FYVE de AdcA nous a donc semblé le déterminant probable de l'association endocytaire de la protéine.

1. *Le domaine FYVE de AdcA est fonctionnel*

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le domaine FYVE de AdcA présentait les propriétés biochimiques d'un domaine FYVE avéré. Le domaine FYVE isolé (acides aminés 463-530) a été cloné en fusion avec la MBP (**M**altose-**B**inding **P**rotein) du côté N-terminal et exprimé en bactéries BL21-DE3. Cette fusion à la MBP a permis une purification du domaine FYVE sous une forme assez dégradée, comportant de la MBP seule et environ 25% de protéine intacte (Figure 30). La modification des conditions d'expression n'a pas permis d'améliorer la qualité de la préparation. La protéine purifiée a été utilisée pour tester son

interaction avec les phosphoinositides, et plus particulièrement le ligand physiologique décrit des domaines FYVE, le PI(3)P.

Une membrane de type PIP strip (ECHELON), sur laquelle différents phospholipides ont été déposés, a été incubée avec la protéine MBP-FYVE et la liaison de MBP-FYVE révélée grâce à un anticorps anti-MBP. La MBP seule a été utilisée comme contrôle dans des conditions identiques. Cette technique de Fat-Western a permis de mettre en évidence une interaction spécifique du MBP-FYVE avec 3 phosphoinositides, le PI(3)P, le PI(4)P et le PI(5)P, avec une interaction forte avec le PI(3)P et une interaction nettement plus faible avec les deux autres phosphoinositides (Figure 31A). Le domaine FYVE de EEA1 est également capable de lier faiblement le PI(5)P, en plus du PI(3)P (Kutateladze and Overduin, 2001).

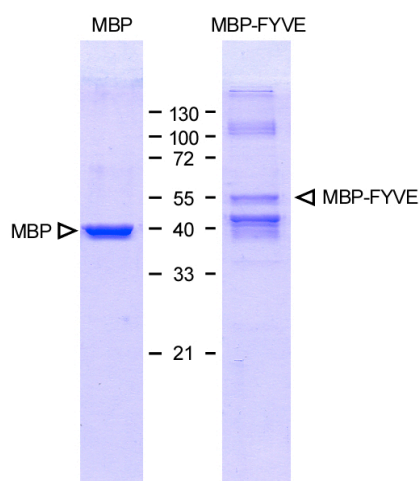


Figure 30 : Purification de la MBP et de MBP-FYVE. Les protéines recombinantes MBP et MBP-FYVE sont exprimées en bactéries et purifiées sur colonne d'amylose. Après lavages extensifs de la colonne, les protéines sont éluées par addition de 10 mM de maltose. La qualité des préparations est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'une fraction aliquotée et coloration au bleu de Coomassie.

L'interaction du domaine FYVE avec la tête polaire du PI(3)P a été confirmée en utilisant l'analogue soluble du PI(3)P, l'Ins(1,3)P₂ et en exploitant les variations de la fluorescence intrinsèque (à 290 nm) de la protéine MBP-FYVE mesurées lors de l'addition de l'analogue. En effet, l'addition d'Ins(1,3)P₂ en concentrations croissantes conduit à une augmentation de la fluorescence intrinsèque (λ_{exc} = 290 nm, λ_{em} entre 300 et 400 nm) de la protéine d'environ 15%. Cette augmentation traduit un changement de conformation du domaine FYVE lors de son interaction avec l'Ins(1,3)P₂ (Figure 31B) et vraisemblablement, une modification de l'environnement de l'unique tryptophane présent dans ce domaine. À partir de la courbe $\Delta F/F$ en fonction de la concentration en Ins(1,3)P₂ et en partant de l'hypothèse d'une interaction

michaelienne, nous avons pu calculer une affinité du domaine FYVE pour l'Ins(1,3)P₂ d'environ 20 μ M, ce qui est comparable aux valeurs publiées pour EEA1 et SARA (Hayakawa *et al.*, 2004). Par analogie avec les résultats obtenus pour ces mêmes protéines, on peut attendre une affinité de AdcA-FYVE pour son ligand physiologique, le PI(3)P, 100 à 1000 fois supérieure à celle calculée pour l'Ins(1,3)P₂ (Kutateladze, 2006).

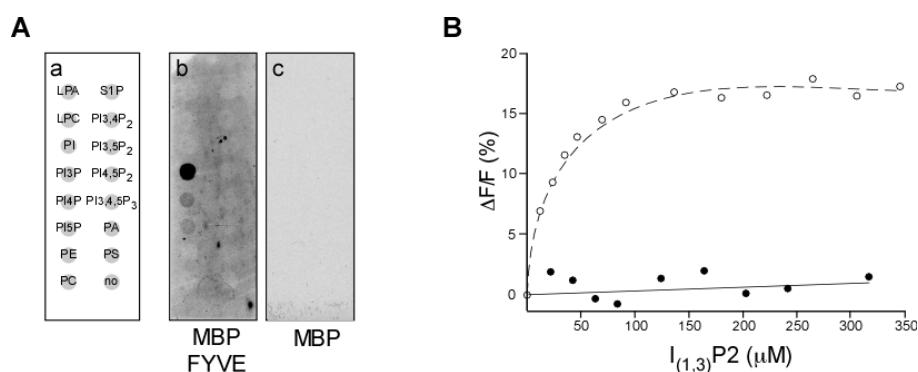


Figure 31 : Le domaine FYVE de AdcA interagit avec le PI(3)P. A. Spécificité d'interaction du domaine MBP-FYVE avec les phosphoinositides. Différents phospholipides sont spotted sur une membrane (voir positions en Aa). MBP-FYVE (Ab) ou MBP seule (Ac) sont mises en incubation avec la membrane et les interactions révélées grâce à un anticorps anti-MBP. **B.** Variation de la fluorescence intrinsèque du tryptophane mesurée à 290 nm pour la protéine FYVE-MBP (cercles vides) ou la MBP seule (cercles pleins) en présence d'Ins(1,3)P₂, un analogue soluble du PI(3)P en concentrations croissantes.

2. Le domaine FYVE de AdcA est essentiel à l'association membranaire de AdcA

L'interaction des domaines en doigt de zinc de type FYVE avec les membranes enrichies en PI(3)P est régulée par deux histidines présentes dans la séquence très conservée R(R/K)HHCR du domaine FYVE et est donc fortement influencée par des variations de pH cytosolique. Dans les cellules HeLa, la modification du pH cytosolique par incubation des cellules dans des tampons à différents pH empêche la fixation de EEA1 au niveau des membranes endosomales (Lee *et al.*, 2005).

Nous avons vu plus haut que la protéine AdcA est associée de façon périphérique aux membranes endosomales lorsque le tampon de casse des cellules est légèrement acide. Pour tester la contribution du domaine FYVE dans cette association membranaire de la protéine AdcA, nous avons examiné la distribution de AdcA_{GFP} après casse des cellules dans des tampons à différents pHs et fractionnement subcellulaire. Aux pHs situés entre 6,0 et 7,0, la

protéine est totalement associée à la fraction membranaire. Elle se partitionne progressivement dans la fraction soluble au fur et à mesure que le pH du milieu de casse utilisé se rapproche de 8,5 (Figure 32). L'association de AdcA avec les membranes est donc pH-dépendante dans la gamme des pHs physiologiques. Ce résultat est compatible avec une implication des histidines du domaine FYVE dans la liaison aux membranes.

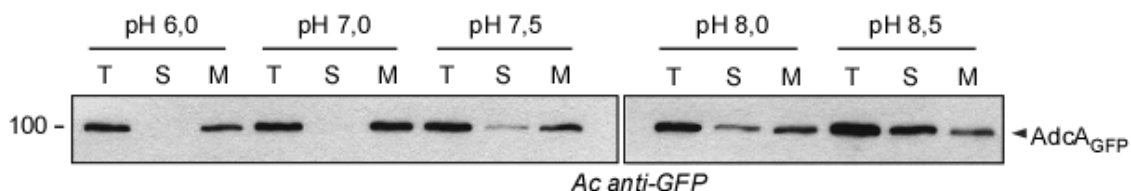


Figure 32 : L'association de AdcA avec les membranes dépend du pH du milieu. Les cellules surexprimant AdcA_{GFP} sont cassées dans des tampons à différents pH et les extraits sont centrifugés à haute vitesse. Les échantillons correspondant au total (T), à la fraction soluble (S) et à la fraction membranaire (M) sont séparés sur gel de polyacrylamide et analysés par Western blot avec un anticorps anti-GFP.

Pour analyser le rôle de FYVE plus en détail, plusieurs mutants de AdcA ont été générés et leur localisation intracellulaire observée. La délétion de la région C-terminale (AdcAΔFY_{GFP}, voir Tableau VIII) conduit à une perte totale de l'association endosomale : la protéine tronquée est essentiellement cytosolique avec quelques agrégats occasionnels dans le cytoplasme (Figure 33A). Dans les expériences de fractionnement subcellulaire, cette forme tronquée de AdcA est effectivement majoritairement soluble dans des conditions de pH où AdcA est entièrement membranaire (Figure 33B). De façon similaire, un mutant dépourvu uniquement de son domaine FYVE (AdcAΔFY_{GFP}, voir Tableau VIII) est également cytosolique (Figure 33A). Afin de s'affranchir d'un possible effet des délétions sur la conformation générale de la protéine, nous avons introduit une mutation ponctuelle dans le domaine FYVE substituant l'arginine 491 en alanine. Cette mutation a été décrite pour abolir la fixation du PI(3)P sans affecter la structure en double doigt de zinc du domaine FYVE de EEA1 (Gaulhier *et al.*, 2000). Cette mutation résulte en une perte complète du recrutement de AdcA^{R491A}_{GFP} sur la voie macropinocytaire (Figure 33A). On observe également une perte de la localisation phagocytaire de AdcA^{R491A}_{GFP} quand les cellules sont placées en présence de zymosan-TRITC. Les phagosomes contenant les particules ne sont jamais positifs pour AdcA^{R491A}_{GFP} qui est retrouvée dans le cytosol et cela quel que soit le temps d'incubation en présence de zymosan (Figure 33C). Le domaine FYVE est donc nécessaire pour la localisation endocytaire de AdcA.

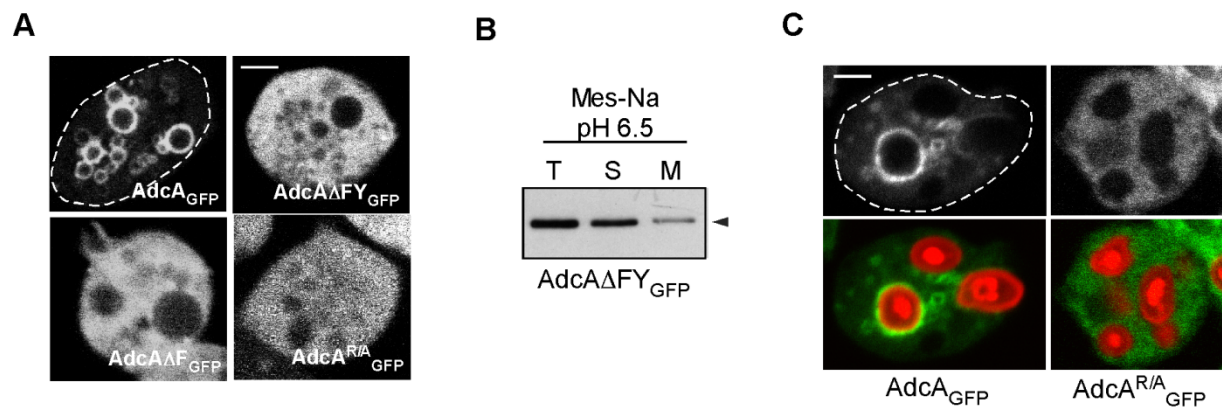


Figure 33 : Le domaine FYVE est nécessaire à la localisation membranaire de AdcA. **A.** Observation en microscopie à fluorescence de cellules surexprimant la protéine AdcA_{GFP} entière, tronquée de ses domaines FYVE-Y (AdcAΔFY_{GFP}), du domaine FYVE seul (AdcAΔFY_{GFP}) ou mutée dans le domaine FYVE (AdcA^{R491A}_{GFP}). **B.** Fractionnement subcellulaire de AdcAΔFY_{GFP} après casse dans un tampon à pH 6,5. T, total ; S, fraction soluble ; M, fraction membranaire. **C.** Localisation de AdcA_{GFP} (à gauche) ou de AdcA^{R491A}_{GFP} (à droite) lors de l'internalisation de levures par phagocytose. Haut, GFP ; bas, superposition en fausses couleurs de la GFP en vert et des levures en rouge. Barre d'échelle, 2 μ m.

3. Le domaine FYVE de AdcA n'est pas suffisant pour le ciblage endocytaire de AdcA

Le domaine FYVE de la protéine SARA exprimé en fusion avec la GFP est suffisant pour cibler la GFP aux endosomes précoces liant EEA1 et Hrs (Itoh *et al.*, 2002). En revanche, le domaine FYVE de EEA1 ou de Hrs sous forme isolée est cytosolique et donc insuffisant pour assurer à lui seul le ciblage endosomal. Pour ces deux domaines, une construction utilisant deux FYVE en tandem permet un recrutement aux endosomes précoces (Gillooly *et al.*, 2000). Une boucle exposée hydrophobe, en amont de la séquence R(R/K)HHCR, joue un rôle dans l'association membranaire des domaines FYVE en s'insérant dans la membrane des endosomes (Kutateladze and Overduin, 2001). Les résidus aromatiques et chargés sont importants pour l'affinité membranaire de cette séquence, appelée MIL (Membrane Insertion Loop ou turret loop) (Blatner *et al.*, 2004) (Figure 34).

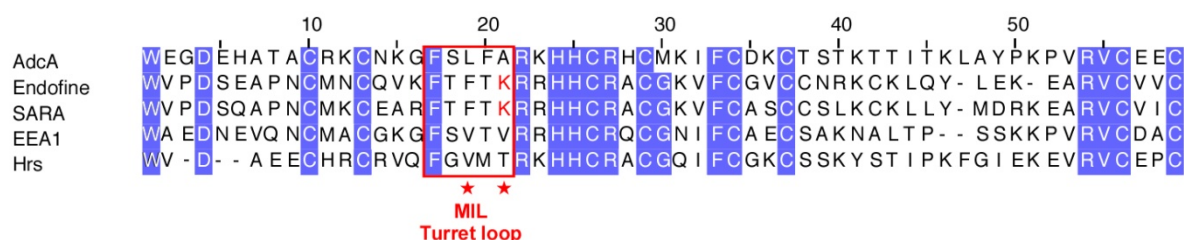


Figure 34 : Boucle d'insertion membranaire (MIL ou turret loop) des domaines FYVE. Les séquences de différents domaines FYVE ont été alignées et leur domaine MIL encadré avec une boîte rouge. Les 2 acides aminés importants pour la localisation endosomale des domaines FYVE sont indiqués par une étoile. La lysine dans la séquence de l'endofine dont la mutation en alanine conduit à une localisation cytosolique de l'endofine est indiquée en rouge.

La localisation membranaire de certaines protéines à domaine FYVE est favorisée par des interactions bivalentes ou multivalentes avec le PI(3)P. Une région en torsade d'hélices située en amont du domaine FYVE forme un homodimère parallèle qui juxtapose deux domaines FYVE et permet leur interaction simultanée avec deux têtes polaires de PI(3)P (Kutateladze, 2006). Cette dimérisation n'est cependant pas absolument nécessaire à la localisation endocytaire d'une protéine à domaine FYVE et AdcA, qui ne possède pas de domaine « coiled-coil » en amont de son domaine FYVE, en est un parfait exemple.

Dans le cas de AdcA, le domaine FYVE seul (FYVE_{GFP}) est incapable de se lier à la membrane et de cibler la GFP sur les endosomes, ceci quelle que soit la position de la GFP (Figure 35A). Ce même domaine exprimé sous la forme d'un tandem (2x(FYVE)_{GFP}) en vue d'augmenter l'avidité de la construction pour le PI(3)P membranaire n'est pas plus efficace.

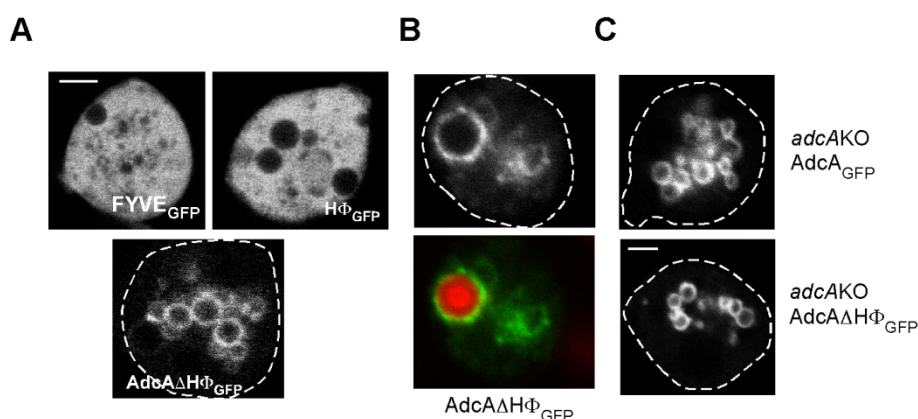


Figure 35 : Importance des domaines FYVE et HΦ dans la localisation subcellulaire de AdcA. **A.** Les cellules de la souche KAx-3 surexprimant le domaine FYVE_{GFP}, le domaine HΦ_{GFP} ou la construction AdcAΔHΦ_{GFP} sont observées vivantes par microscopie à fluorescence pour la localisation de la construction mentionnée. **B.** Les cellules de la souche KAx-3 surexprimant AdcAΔHΦ_{GFP} sont mises en présence de zymosan marqué au Texas-Red pendant 1h puis observées au microscope confocal. Le panneau du haut correspond à la distribution de AdcAΔHΦ_{GFP} et le panneau du bas à la superposition de ce même marquage avec celui du zymosan phagocyté. **C.** AdcA_{GFP} et AdcAΔHΦ_{GFP} sont exprimées dans le mutant adcA nul et leur localisation subcellulaire observée en microscopie à fluorescence. Barre d'échelle, 2 μm.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- 1) Le domaine FYVE isolé n'adopte pas une conformation appropriée pour la reconnaissance du PI(3)P et son ancrage partiel à la membrane.

- 2) Le domaine FYVE n'est pas suffisant pour l'association membranaire et un partenaire protéique ou simplement un autre domaine de AdcA contribue à l'interaction de la protéine avec les membranes des endosomes enrichies en PI(3)P. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la lysine de la boucle d'insertion membranaire présente dans le domaine FYVE de SARA et de l'endofine (séquence FTFTK, Figure 34) n'est pas conservée dans le domaine FYVE de AdcA (séquence équivalente FSLFA).

De façon intéressante, le remplacement de la lysine chargée par une alanine fait dramatiquement chuter l'affinité du FYVE de l'endofine pour les endosomes précoces, et la protéine mutée est cytosolique (Blatner *et al.*, 2004).

Dans le cadre de cette deuxième hypothèse, nous avons testé la possibilité que l'extrémité N-terminale de AdcA contenant notamment la région hydrophobe Φ puisse participer avec le domaine FYVE au ciblage endosomal. Deux mutants de AdcA ont été construits et exprimés dans la souche parentale : l'un limité au domaine N-terminal seul de AdcA ($H\Phi_{GFP}$) et l'autre correspondant à une délétion de ce domaine ($AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$). L'observation en microscopie des souches exprimant ces protéines montre que la région N-terminale $H\Phi$ n'est pas essentielle à la localisation endocytaire de AdcA : le domaine $H\Phi$ seul est très majoritairement cytosolique (Figure 35A) et sa délétion n'affecte pas la localisation vésiculaire de la protéine tronquée $AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$ (Figure 35A et B). De façon similaire, $AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$ est toujours recrutée sur les phagosomes contenant des levures (Figure 35B).

La protéine AdcA étant capable de former des homo-oligomères (paragraphe V), la construction $AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$ a été exprimée dans le contexte d'un mutant nul pour AdcA afin d'éliminer la possibilité que la construction $AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$ soit recrutée à la membrane uniquement parce qu'elle oligomériserait avec la protéine AdcA endogène. La localisation de $AdcA\Delta H\Phi_{GFP}$ est toujours vésiculaire et comparable à celle de AdcA endogène (Figure 35C). Ce résultat prouve de façon non ambiguë que le domaine $H\Phi$ n'est pas requis pour la liaison de AdcA aux endosomes précoces.

Des travaux de localisation menés sur le cœur arrestine ($AdcA-NC_{GFP}$) n'ont pas été concluants du fait que le domaine AdcA-NC exprimé en fusion avec la GFP se présente sous la forme d'un point, voire quelques uns à proximité immédiate du noyau. Actuellement, la nature de ce(s) spot(s) est inconnue. Des résultats récents ayant identifié AdcA dans le

protéome centrosomal de *Dictyostelium* (Reinders *et al.*, 2006), nous avons vérifié une co-localisation éventuelle de AdcA-NC_{GFP} avec des marqueurs avérés du centrosome. Un marquage avec un anticorps dirigé contre la γ -tubuline ou la protéine CP224 montre que les marquages sont distincts et que le point décoré par AdcA-NC_{GFP} n'est pas le centrosome (Figure 36).

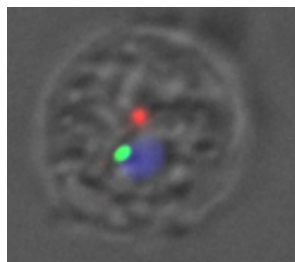


Figure 36 : Le cœur arrestine AdcA-NC_{GFP} n'est pas localisé sur le centrosome. La souche KAx-3 surexprimant la construction AdcA-NC_{GFP} est fixée en MeOH et marquée avec un anticorps anti-CP224 spécifique du centrosome. La superposition des figures montre bien que les deux marquages sont disjoints.

V. La protéine AdcA forme des oligomères

A. Le domaine H est capable d'homo-oligomériser de façon métal-dépendante

Le domaine H est composé de trois régions très conservées contenant chacune cinq ou six histidines consécutives. Nous avons tiré avantage de cet étiquetage poly-histidine naturel pour purifier le domaine H sur une colonne de Ni-NTA (Figure 37). La protéine recombinante a ainsi pu être purifiée avec un degré de pureté supérieur à 95%, confirmant par ailleurs la capacité de AdcA à fixer des métaux divalents.

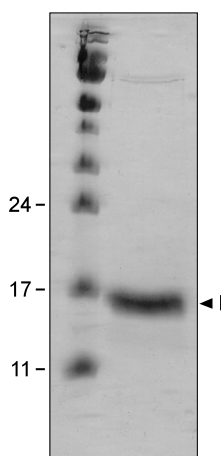


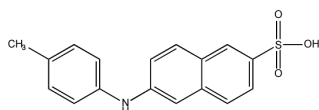
Figure 37 : Purification du domaine H. Le domaine H est exprimé sous forme recombinante en bactéries et purifié par affinité sur colonne de Nickel-NTA immobilisé. Le tampon de colonne contient 50 mM NaPi pH 8,0, 300 mM NaCl et 20 mM imidazole. La colonne est lavée en tampon de colonne contenant 80 mM imidazole et le domaine H est finalement élué par un tampon de colonne contenant 150 mM imidazole. La pureté de la préparation est estimée sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, après coloration au bleu de Coomassie

1. Le domaine H répond aux métaux divalents par l'exposition de zones hydrophobes

Chez certaines calciprotéines, la liaison du métal entraîne un changement de conformation de la protéine, qui se traduit parfois par une modification de la fluorescence intrinsèque de la protéine (Aubry *et al.*, 2002). Nous avons donc dans un premier temps analysé la réponse du domaine H aux métaux divalents en suivant sa fluorescence intrinsèque en présence de différents métaux de transition dont le nickel. Le domaine H est dépourvu de tryptophane mais la construction utilisée contient une tyrosine (Y³) en N-terminal. Malgré un rendement quantique de fluorescence bien plus faible que pour les tryptophanes, cette tyrosine permet de mesurer un spectre de fluorescence intrinsèque pour le domaine H avec un pic d'excitation à $\lambda_{\text{ex}}=260$ nm. Ce spectre de fluorescence n'est pas modifié suite à l'addition de métaux. La tyrosine Y³ n'est donc pas un bon rapporteur d'un éventuel changement de conformation du domaine induit par l'addition de métaux.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le TNS (acide 2-(p-toluidino)-6-naphthalene sulfonique), une sonde lipophile dont la fluorescence est exacerbée quand elle se retrouve dans un environnement hydrophobe (Figure 38A). Quand le TNS est ajouté à une solution contenant le domaine H purifié et du nickel, la fluorescence basale est fortement exaltée (Figure 38B).

A



Acide 2-(p-toluidinyl)naphthalene-6-sulfonique (2,6-TNS)

B

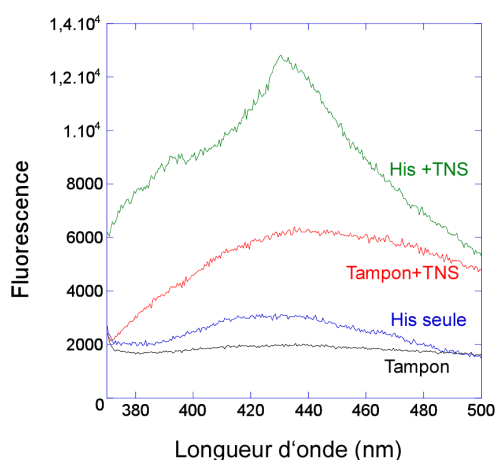


Figure 38 : Le domaine H expose des zones hydrophobes en présence de métal. A. Molécule de TNS. B. Spectres d'émission de fluorescence du TNS seul, du TNS lié au domaine H. Trace noire, tampon seul ; trace bleue, solution de domaine H ; trace rouge, TNS en tampon ; trace verte, TNS ajouté à une solution de domaine H. Le milieu utilisé pour la spectroscopie contient 50 mM NaPi pH 7,5 et 300 mM NaCl. Le TNS et le domaine H sont utilisés à des concentrations de 1 μ M.

Cette augmentation de fluorescence est partiellement réversée par l'ajout d'EDTA (Figure 39A, B). Une nouvelle addition de nickel restimule la fluorescence qui est directement dépendante de la concentration en nickel libre. Ces variations de fluorescence traduisent les changements de conformation de la protéine lors de l'addition de chélateur ou de métal, changements qui s'accompagnent de l'exposition de zones hydrophobes.

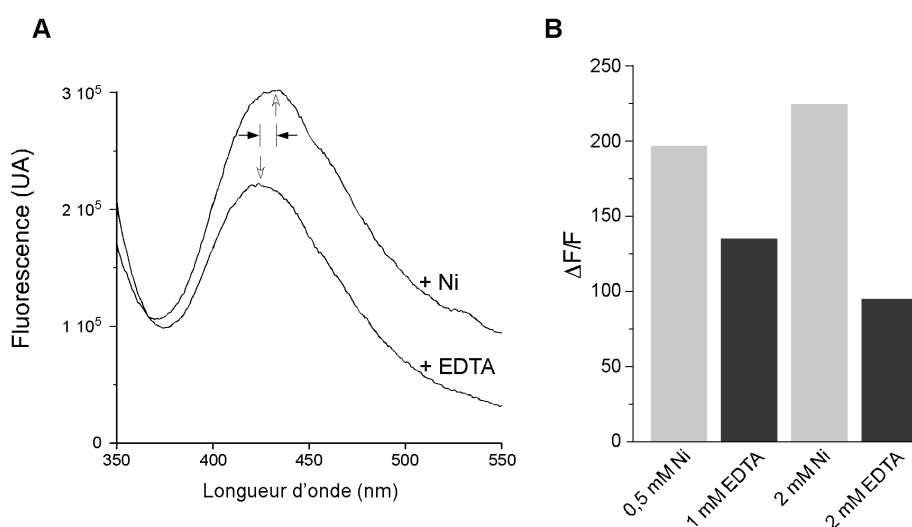


Figure 39 : L'exposition par le domaine H de zones hydrophobes en présence de nickel est réversible. A. Spectres d'émission de fluorescence du TNS lié au domaine H dans un tampon contenant soit 1 mM d'EDTA, soit 0,5 mM de nickel. En présence de chélateur de métaux (EDTA), la fluorescence du TNS atteint un niveau basal. L'addition de nickel induit une augmentation de cette fluorescence, signe de l'exposition de zones hydrophobes et un effet bathochrome (déplacement du pic d'émission vers les longueurs d'onde élevées). B. Histogrammes d'intensité de fluorescence (intégration du pic) du TNS en présence du domaine His et des concentrations variables d'EDTA ou de nickel.

2. Le domaine H forme des complexes de haut poids moléculaire

Une des réponses possibles du domaine H au changement de conformation et l'exposition de zones hydrophobes induit par les métaux est une oligomérisation. Nous avons analysé le comportement du domaine H recombinant purifié (116 acides aminés, M_r 12,45 kDa) sur une colonne de tamisage de type Sephadex G150 équilibrée en 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 et 150 mM NaCl. Dans ces conditions de chromatographie, le domaine H est élué à un volume qui correspond à la masse d'une protéine globulaire de 25 kDa. Cela correspond pour le domaine H à un équilibre entre une forme monomérique et une forme dimérique, si la protéine est effectivement globulaire. Si la forme du domaine H est fortement asymétrique et allongée, ce volume d'éluion peut correspondre à celui d'un monomère. Quand le domaine H purifié est

mis en présence d'un tampon de colonne contenant 25 μ M de nickel pendant 1h puis passé sur la colonne de Sephadex G150, il est élué en partie plus rapidement, avec un volume d'élution assez large correspondant à des formes oligomériques hétérogènes de haut poids moléculaire allant jusqu'à l'hexamère (Figure 40).

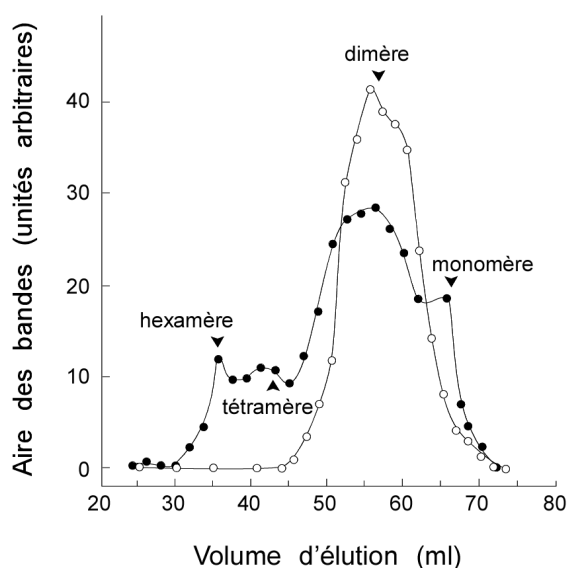


Figure 40 : Le domaine H forme des oligomères de façon métal dépendante. Le domaine H recombinant, purifié sur colonne de Ni-NTA est filtré par chromatographie d'exclusion sur une colonne de Sephadex G150 équilibrée en 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 et 150 mM NaCl en absence (○) ou en présence de 25 μ M nickel (●). La quantité de protéines dans les différentes fractions est mesurée par densitométrie des bandes après séparation des protéines sur gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie.

3. Le domaine H forme des homo-oligomères

La technique de résonance plasmonique de surface nous a permis de confirmer cette homo-oligomérisation. Le domaine H purifié a été fixé de façon covalente sur une microplaque Sensor Chip CM5 Biacore® et ajouté par ailleurs dans la phase mobile. Lorsque le tampon d'interaction contient 200 μ M d'EDTA, aucune interaction n'est mesurée (Figure 41). En revanche, l'addition de 200 μ M de Ni à l'analyte se traduit par l'acquisition d'un signal de résonance qui témoigne d'une interaction du domaine H en solution dans l'analyte avec le domaine H immobilisé sur la microplaque (Figure 41). Différents métaux de transition à la concentration en métal de 200 μ M ont été testés pour leur efficacité à provoquer l'oligomérisation du domaine H. Les métaux testés permettent tous une oligomérisation du domaine et peuvent être classés selon leur ordre d'efficacité (à une concentration de 200 μ M): Ni>Co>Zn=Cu>Mn>Fe (Figure 41). A ce stade, il est impossible de préciser quel métal se lie

à AdcA dans les conditions physiologiques et le reste de notre étude du domaine H a été mené en utilisant le Ni.

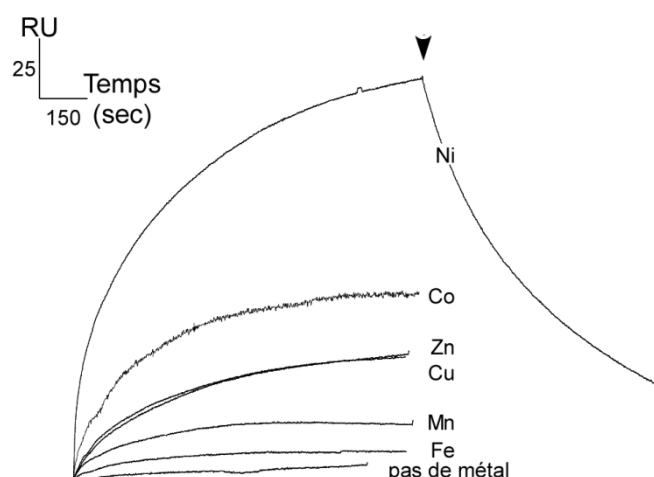


Figure 41: Le domaine H oligomérisé en présence de métaux de transition. Le domaine H recombinant est lié de façon covalente à une microplaque CM5 Biacore chip. Le domaine H est également mis en solution dans le tampon d'interaction (25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl). L'oligomérisation du domaine H est enregistrée en fonction du temps, lorsque différents métaux de transition sont ajoutés à une concentration de 200 μ M. Une courbe de dissociation est montrée pour la condition "nickel". La tête de flèche noire indique l'élimination de la protéine H de l'analyte.

Les courbes d'association et de dissociation en présence de H en concentrations variables dans l'analyte et d'une concentration saturante de Ni (100 μ M) ont permis de calculer l'affinité d'oligomérisation du domaine H à partir des équations de Langmuir (voir Matériel et Méthodes) (Figure 42). Les courbes d'association ont été modélisées par un modèle mathématique d'interaction simple 1 : 1 correspondant à la réaction : $A + B \rightleftharpoons AB$ où A est l'analyte et B le ligand immobilisé (dans notre étude, $A=B$). La courbe de R_{eq} en fonction de la concentration en nickel est michaelienne. La concentration de nickel qui permet une demi-oligomérisation de H est de l'ordre de 5-10 μ M. La courbe du K_D (calculé à partir de courbes d'association-dissociation) en fonction de la concentration en nickel indique que l'affinité protéine-protéine (oligomérisation de H) est la plus forte (5 μ M) pour une concentration optimale en nickel qui est également de l'ordre de 5 μ M. La courbe de k_s (valeurs obtenues à une concentration saturante de nickel de 100 μ M) en fonction de la concentration de H dans l'analyte permet également d'estimer une affinité apparente du complexe oligomérique de H. Encore une fois, cette affinité est d'environ 5 μ M.

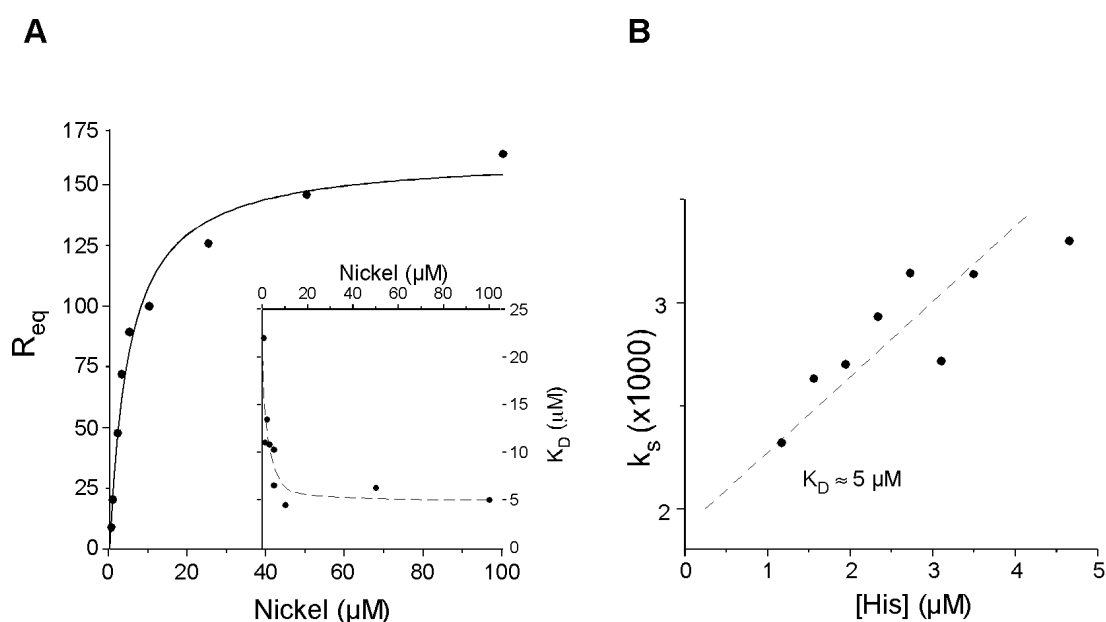


Figure 42: Affinité apparente d'oligomérisation du domaine H. A. Les valeurs de R_{eq} pour des concentrations variables en nickel sont calculées à partir des isothermes d'association. La courbe R_{eq} en fonction de la concentration en Ni situe la concentration de Ni permettant une demi-oligomérisation à 5-10 μM . Les valeurs du K_D d'oligomérisation du domaine H sont calculées à partir des isothermes d'association et de dissociation à des concentrations de nickel variables. L'affinité la plus forte (estimée à 5 μM) est obtenue pour une concentration de nickel supérieure ou égale à 5 μM . B. Les valeurs de k_s ont été calculées à partir de courbes d'association avec des concentrations variables de domaine H et une concentration saturante de nickel (100 μM). La représentation de k_s en fonction de la concentration protéique dans l'analyte donne un K_D d'oligomérisation de H de 5 μM .

Ces résultats confirment la capacité du domaine à former des oligomères en présence de métal. La nature du métal qui induit l'oligomérisation dans la cellule reste à établir. La réalité physiologique de cette oligomérisation peut être discutée du fait que les concentrations optimales en métal qui la permettent sont relativement élevées (5 μM), mais restent malgré tout raisonnables. Il est possible toutefois que l'affinité de la protéine entière pour le métal soit plus élevée, du fait d'une conformation différente de celle du domaine H isolé. Par ailleurs, le domaine H pourrait également être la cible de modifications post-traductionnelles susceptibles de modifier son affinité ou sa capacité d'oligomérisation.

Il est à noter que les résultats de résonance plasmonique de surface avec le domaine H sont en contradiction partielle avec ceux des expériences de filtration sur gel. La résonance plasmonique de surface montre une absence d'interaction en EDTA et une interaction forte en métal. La filtration sur gel suggère un état monomérique-dimérique en EDTA et multimérique en présence de métal. L'interprétation la plus simple est de proposer que le domaine H purifié à partir de bactéries, immobilisé sur la microplaque ou circulant, est déjà dans un état

oligomérisé. L'addition d'EDTA ne modifie pas cet état ; en revanche l'ajout de Ni permet la transition vers un état oligomérique plus élevé.

B. La protéine AdcA est capable de former des oligomères *in cellulo*

Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'état d'oligomérisation de AdcA dans des conditions plus physiologiques. Deux approches ont été privilégiées : la chromatographie d'exclusion moléculaire et la co-immunoprécipitation.

1. *AdcA est présente dans des complexes de haut poids moléculaire*

Pour étudier le comportement d'oligomérisation de la protéine AdcA entière, nous avons tiré parti du mutant AdcA^{R491A}_{GFP} qui n'est plus associé aux membranes. Les cellules Ax3 surexprimant AdcA^{R491A}_{GFP} ont été cassées dans un tampon contenant 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 8,5 et supplémenté éventuellement avec 1 mM EDTA. Le surnageant obtenu après centrifugation à 100 000 x g pendant une heure est déposé sur une colonne de Sephacryl S300.

En absence de chélateur, AdcA^{R491A}_{GFP} est éluée sous la forme d'un large pic correspondant à des complexes hétérogènes de haut poids moléculaire (600 kDa - 3000 kDa) (Figure 43). De tels complexes pourraient correspondre à des homopolymères de 6 à 20 sous-unités, dans l'hypothèse d'une conformation globulaire de AdcA, ou bien des hétéro-oligomères avec des partenaires de AdcA non identifiés.

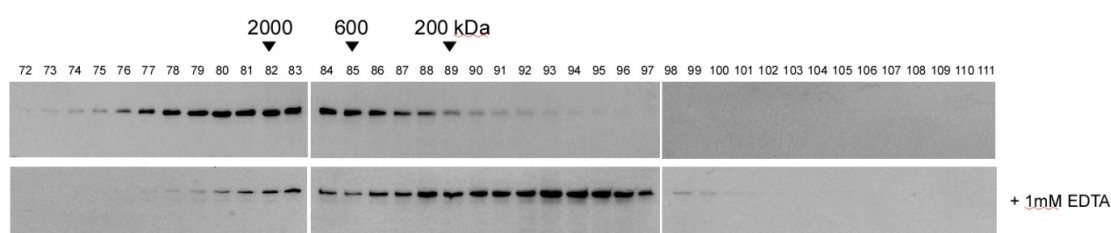


Figure 43 : Tamisage de la protéine AdcA sur une colonne de Sephacryl S300. Effet de l'addition d'un chélateur. L'extrait soluble (5.10^8 cellules) d'une souche surexprimant la protéine AdcA^{R491A}_{GFP} est filtré sur une colonne Sephacryl S300 (180 ml) équilibrée en tampon de casse (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) supplémenté ou non avec 1 mM d'EDTA. L'élution de la colonne est calibrée à l'aide de protéines standard (bleu-dextran pour le volume mort de la colonne, thyroglobuline, apoferritine, beta-amylase, alcool déshydrogénase, séralbumine bovine, cytochrome c). Les fractions d'élution sont analysées par Western blot avec un anticorps anti-GFP.

L'addition de 1 mM EDTA à l'extrait cytosolique et au tampon de colonne conduit à l'élution plus tardive de la protéine, à un volume d'élution compatible avec une forme majoritairement monomérique avec un épaulement dimérique (Figure 43). Ce résultat indique que la protéine soluble $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$ est associée à des complexes (homo- ou hétéro-oligomériques) dont la stabilité dépend des métaux.

2. AdcA_{GFP} interagit avec RFPAdcA et avec AdcA endogène

Des expériences de co-immunoprécipitation sur des lysats d'une souche co-exprimant AdcA_{GFP} et RFPAdcA ont permis de confirmer l'homo-oligomérisation. La protéine AdcA_{GFP} a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-GFP couplé à des billes d'agarose-protéine G en présence de 1 mM EDTA. La souche parentale co-exprimant RFPAdcA avec la GFP seule a été utilisée comme contrôle. Une révélation du Western blot avec l'anticorps anti-RFP montre clairement que la protéine RFPAdcA est co-immunoprécipitée avec AdcA_{GFP} mais pas avec la GFP seule (Figure 44A). Des expériences similaires réalisées sur la souche KAx-3 exprimant AdcA_{GFP} montre que la protéine endogène également peut être co-immunoprécipitée avec AdcA_{GFP} (Figure 44B). Ces résultats indiquent donc clairement que la protéine AdcA est capable de former des complexes oligomériques de façon métal-indépendante.

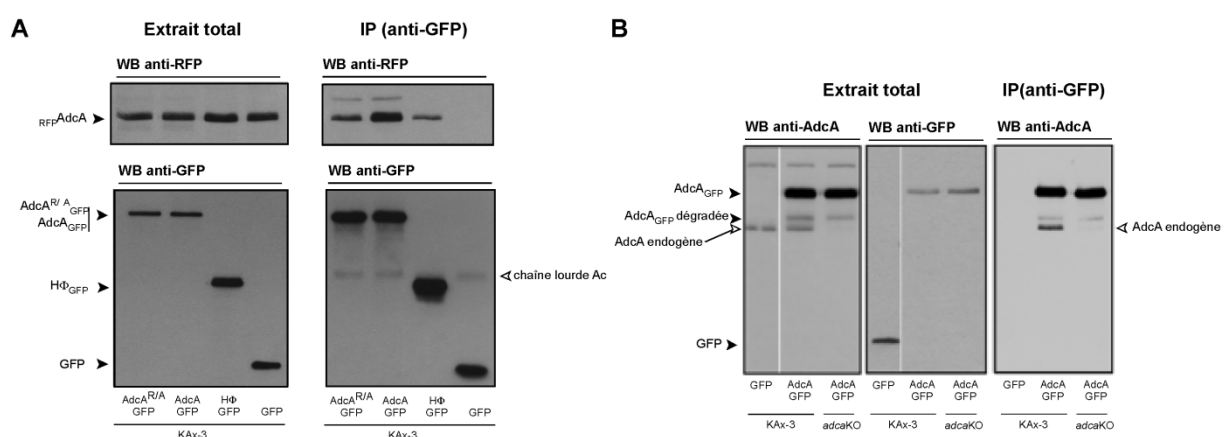


Figure 44 : AdcA forme des homo-oligomères dans la cellule. A. Des immunoprécipitations par un anticorps anti-GFP sont réalisées sur des lysats cellulaires à partir des souches KAx-3 co-exprimant RFPAdcA et AdcA_{GFP} , $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$ ou $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$. Les extraits totaux et les protéines immunoprécipitées sont séparés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et analysés en Western blot avec un anticorps anti-GFP ou anti-RFP. B. Des expériences similaires sont réalisées sur la souche KAx-3 surexprimant AdcA_{GFP} . L'analyse par Western blot a été réalisée avec des anticorps anti-GFP et anti- AdcA (AcC- AdcA). La souche adcA nulle surexprimant AdcA_{GFP} a été utilisée pour valider la bande AdcA endogène.

3. Implication des différents domaines de AdcA dans l'oligomérisation

Afin de préciser le(s) domaine(s) d'oligomérisation, les co-immunoprécipitations ont été faites sur des lysats provenant de la souche parentale co-exprimant RFPAdcA et $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$ ou $\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$ (voir Tableau VIII).

Les résultats montrent que RFPAdcA peut être co-immunoprécipitée avec une forme de AdcA où le domaine FYVE est muté et incapable de lier le PI(3)P membranaire et avec une forme de AdcA limitée à son domaine H Φ . Il est intéressant toutefois de noter que ces deux constructions interagissent avec RFPAdcA de façon moins efficace que la protéine sauvage (Figure 44). Ces données sont en faveur d'un site d'oligomérisation de AdcA au niveau de son domaine H Φ . La diminution observée de la capacité d'oligomérisation de AdcA avec le domaine H Φ pourrait être liée à une conformation différente de H Φ sous forme isolée ou intégrée dans la protéine entière. Les données utilisant le mutant $\text{AdcA}^{\text{R491A}}_{\text{GFP}}$ suggèrent que le domaine FYVE contribue également à l'interaction soit en tant que deuxième site d'oligomérisation ou du fait d'un rôle de la localisation membranaire dans l'oligomérisation. L'utilisation d'un co-expresseur $\text{RFPAdcA}/\text{AdcA}\Delta\text{H}\Phi_{\text{GFP}}$ permettra de consolider ces observations.

Le non-ajout d'EDTA dans le tampon de lyse conduit à un niveau global de dégradation plus important sans doute lié à l'activation de calciprotéases mais n'affecte pas de façon notable l'interaction. Un tel résultat est attendu dans la mesure où dans nos conditions d'immunoprécipitation, les anticorps sont mis en excès.

L'intégration de ces résultats d'immunoprécipitation avec les données de filtration sur gel et de résonance plasmonique de surface nous amène à proposer un modèle d'un dimère de AdcA EDTA-insensible et d'un multimère de degré plus élevé en présence de métal.

PARTIE III. ETUDE DU ROLE FONCTIONNEL DE LA PROTEINE ADCA

Afin d'aborder la caractérisation fonctionnelle d'AdcA, le gène codant pour la protéine a été inactivé par recombinaison homologue. Tardivement au cours de mon travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence par analyse protéomique l'expression en phase végétative de la protéine AdcD alors que nos expériences de Northern blot montraient une expression tardive en développement. Etant donné ce niveau d'expression faible au stade végétatif et malgré le fait que AdcA et AdcD ne soient pas des homologues au sens strict, nous avons envisagé la possibilité d'une redondance partielle de fonction et réalisé la double mutation *adcA/adcD* nulle.

I. Obtention des mutants *adcA* et *adcA/adcD* nuls**A. Elaboration des constructions d'inactivation d'*adcA* et *adcD***

- **le gène *adcA*** : Pour établir la construction d'inactivation du gène *adcA*, deux séquences d'ADN ont été synthétisées par PCR, la première d'une longueur de 496 pb dans la partie 3' du gène avec les oligonucléotides ARA1/ARA2 (portant les sites de restriction *EcoRI* pour ARA1 et *BamHI* pour ARA2), et la seconde de 795 pb dans la partie 5' du gène avec les oligonucléotides ARA3/ARA4 (portant les sites de restriction *BamHI* pour ARA3 et *ClaI* pour ARA4). Les deux fragments d'ADN ont été clonés dans le vecteur SP72 et le site *BamHI* a permis l'insertion de la cassette *Bs^R* de résistance à la blasticidine. L'ensemble vecteur/insert a ensuite été digéré avec l'enzyme *EcoRI* avant électroporation dans les cellules KAx-3 ou JH10 *adcD* nulles.

- **le gène *adcD*** : En ce qui concerne l'inactivation de *adcD*, les régions en 3' et en 5' utilisées ultérieurement pour la recombinaison ont été amplifiées grâce aux oligonucléotides ARD1(*EcoRI*)/ARD2(*BamHI*) et ARD3(*BamHI*)/ARD4(*XbaI*) respectivement et sous-clonées dans le vecteur SP72 (cartes des vecteurs annexe 3). La cassette *THY* d'auxotrophie pour la thymidine a été insérée dans le site *BamHI* et la construction a été digérée avec les enzymes *EcoRI-EcoRV* avant électroporation dans la souche JH10, une souche auxotrophe pour la thymidine construite par inactivation du locus *thy1* codant la thymidylate synthase (Hadwiger and Firtel, 1992).

B. Sélection des clones invalidés

Les cellules électroporées ont été sélectionnées en présence de blasticidine ou dans un milieu sans thymidine exogène selon la construction utilisée. Après sélection, des clones ont été obtenus par étalement sur un tapis de *Klebsiella aerogenes* et testés pour leur génotype par Southern blot. L'absence de la protéine a également été analysée par Western blot.

En ce qui concerne le gène *adcA*, la vérification par Southern blot s'est appuyée sur l'utilisation d'une sonde marquée à la digoxygénine correspondant au fragment ARA4/ARA21. L'ADN génomique des clones sélectionnés a été digéré par l'enzyme *EcoRV* : pour la souche sauvage, un signal à 800 pb est attendu (taille de la séquence entre les deux sites *EcoRV*) et un signal à environ 2100 pb est attendu pour les mutants *adcA* nuls. Cinq mutants ont été confirmés (Figure 45A). En Western blot, l'invalidation d'*adcA* se traduit par l'absence de la protéine à 70 kDa (Figure 45B). L'étude du phénotype *adcA* nul s'est faite sur les clones 1 et 5. Par souci de clarté dans la suite du manuscrit, seuls les résultats obtenus avec le mutant 5 ont été présentés.

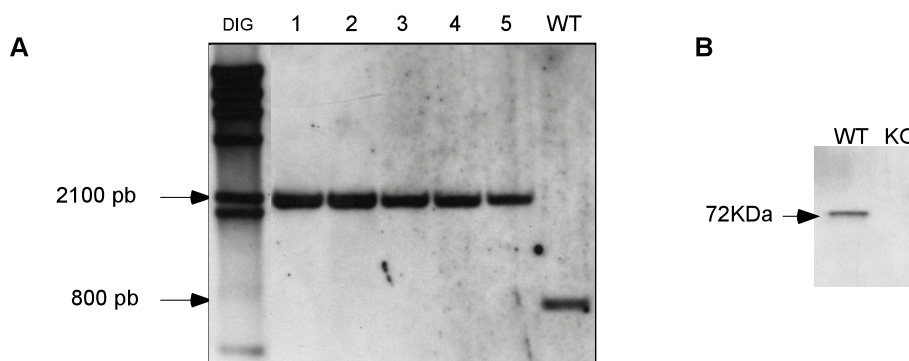


Figure 45 : Contrôle de l'invalidation de *adcA* et sélection des souches. **A.** Après extraction des différents clones (1 à 5) et de la souche parentale (WT), l'ADN génomique est digéré avec l'enzyme *EcoRV*. Un Southern blot réalisé avec une sonde froide dirigée contre le gène *Dd-adcA* (kit DIG system de Roche®) a permis de confirmer le génotype des mutants. La bande à 800 pb correspond au gène *Dd-adcA* sauvage et la bande à 2100 pb au gène *Dd-adcA* interrompu par la cassette *BsR* (800 bp + 1300 bp de cassette). **B.** Des extraits protéiques totaux obtenus à partir de la souche parentale (WT) ou du mutant *adcA* nul sont analysés par western blot avec l'anticorps anti-*AdcA* AcC-*AdcA*.

Pour générer le mutant double-nul *adcA/adcD* nul, l'invalidation de *adcD* a été réalisée dans la souche JH10 et validée par Southern blot. L'ADN génomique a été digéré par les enzymes *EcoRI* et *EcoRV* et la sonde utilisée a été générée à l'aide des oligonucléotides ARD3/ARD4 : l'insertion de la cassette THY conduit à une augmentation de taille de 1338 kb à 2638 kb par rapport à la souche parentale (Figure 46). Trois des 7 mutants validés pour

l'invalidation de *adcD* ont été utilisés pour générer le double mutant *adcA* nul/*adcD* nul par insertion de la cassette Bsr dans le locus *adcA*. Deux mutants n'exprimant ni AdcA ni AdcD ont été obtenus.

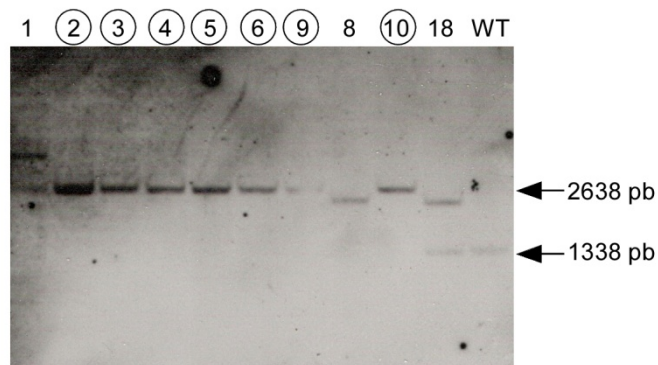


Figure 46 : Contrôle de l'invalidation du gène *adcD*. Southern blot réalisé avec une sonde froide dirigée contre le gène *Dd-adcD* (kit DIG system de Roche®). La bande à 1338 pb correspond au gène *Dd-adcD* sauvage et la bande à 2638 pb au gène *Dd-adcD* ayant incorporé la cassette Bsr (1338 bp + 1300 bp de cassette). Les clones dont les numéros sont encadrés correspondent à la recombinaison voulue. Les clones 2, 4 et 6 ont été conservés.

Les expériences de caractérisation phénotypiques ont été initialement réalisées sur le mutant *adcA* nul, puis reproduites sur le double mutant *adcA* nul/*adcD* nul.

II. Caractérisation phénotypique des mutants *adcA* nul et *adcA/adcD* nul

Du fait de la non-connaissance *a priori* des partenaires d'AdcA pouvant nous guider dans notre analyse de phénotype, différents aspects de la biologie de l'organisme ont été étudiés en détail de façon à déterminer l'impact de l'invalidation d'*adcA*.

A. La mutation *adcA* nulle n'affecte pas la croissance cellulaire

Dans un premier temps, nous avons mesuré les courbes de croissance de la souche parentale et du mutant *adcA* nul. En milieu liquide axénique, la souche parentale KAx-3 se multiplie avec un temps de génération d'environ 10h et une densité cellulaire de $2 \cdot 10^7$ cellules/ml au plateau. L'invalidation d'*adcA* s'accompagne d'un léger ralentissement du temps de doublement plus proche de 11h. Le plateau de croissance est maintenu à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml (Figure 47A). Des valeurs similaires ont été obtenues pour le mutant *adcA/adcD* nul.

B. L'invalidation d'*adcA* n'a pas d'effet sur le programme de développement multicellulaire

L'étude du profil d'expression temporelle d'AdcA (voir Figure 24) a mis en évidence que AdcA est principalement exprimée en phase végétative et disparaît rapidement avec l'entrée en développement. Un tel profil ne suggère pas d'emblée un rôle majeur au cours du développement. Néanmoins, étant donné que des protéines spécifiques de la phase végétative sont nécessaires à la mise en place du programme développemental, nous avons comparé les différentes étapes du cycle de développement dans la souche *adcA* nulle et dans la souche parentale après étalement sur un agar non nutritif.

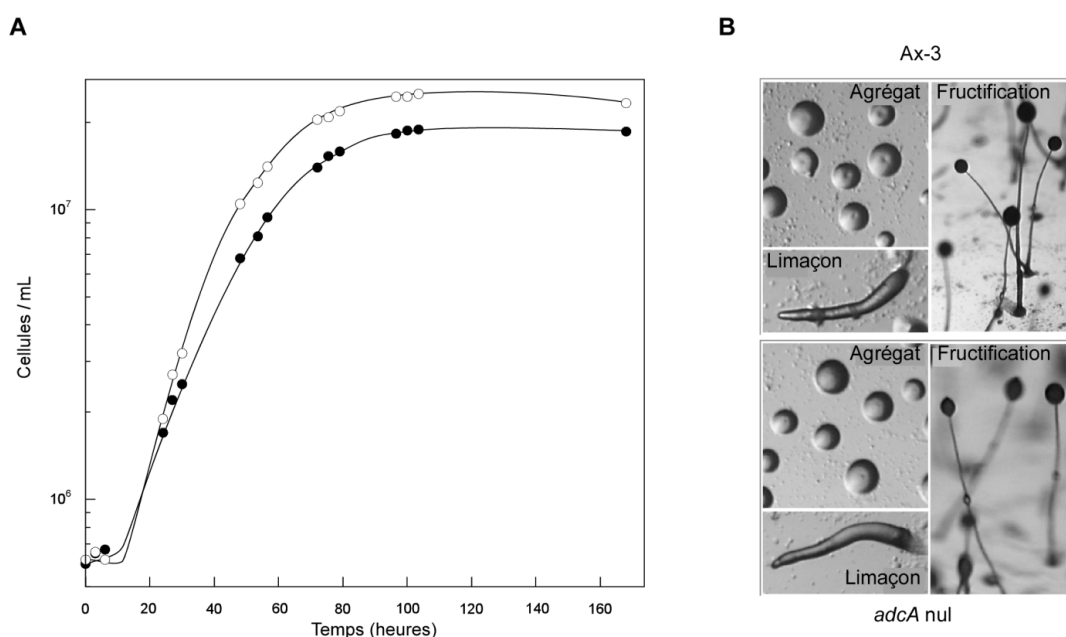


Figure 47 : Croissance et développement des souches KAx-3 et *adcA* nulle. A. Courbes de croissance réalisées en milieu axénique obtenues pour les souches WT (○) et *adcA* nulle (●). B. Photographies de différentes étapes du développement des souches parentale (en haut) et *adcA* nulle (en bas).

En situation de carence nutritive, les deux souches agrègent et se développent avec une cinétique comparable (Figure 47B). Les fructifications présentent une morphologie similaire. Au sein des fructifications *adcA* nulles, ni les cellules tiges ni les cellules spores ne présentent de défauts apparents. L'invalidation additionnelle de *adcD* dans la souche *adcA* n'affecte pas non plus le développement.

C. L'activité d'endocytose n'est pas altérée dans la souche *adcA* nulle

La localisation endocytaire de la protéine AdcA nous a amenés à déterminer si l'absence de la protéine AdcA avait des répercussions sur les principaux mécanismes d'endocytose de *Dictyostelium* que sont la macropinocytose et la phagocytose.

- La macropinocytose : l'activité macropinocytaire de la souche *adcA* nulle a été mesurée à l'aide du FITC-dextran comme marqueur de phase fluide. Comme pour la souche parentale, l'entrée de fluide dans les cellules *adcA* nulles suit une cinétique biphasique avec une phase linéaire d'entrée permettant de calculer une vitesse d'internalisation d'environ 8,5 fl/min/cellule (identique à la souche parentale) et un plateau (750 fl \pm 100 fl pour la souche WT vs 670 fl \pm 80 fl pour la souche *adcA* nulle) correspondant à un équilibre dynamique entre l'entrée de fluide par endocytose et sa sortie par exocytose. Comme illustré sur la Figure 48A, la souche *adcA* nulle ne présente pas d'anomalie majeure dans le processus de macropinocytose.

- La phagocytose : la capacité du mutant *adcA* nul à se développer sur un tapis de *K. aerogenes* pendant la phase d'obtention des mutants nuls était déjà une première indication que ses propriétés de phagocytose n'étaient pas grossièrement affectées. L'analyse de la phagocytose de billes fluorescentes par cytométrie de flux (FACS) a confirmé ces résultats. Comme l'illustre la Figure 48B, le mutant *adcA* nul présente une activité de phagocytose de billes de latex comparable à celle du parent.

L'ensemble des paramètres de macropinocytose et de phagocytose ne sont pas différents dans la souche *adcA/adcD* nulle.

Les résultats obtenus en termes d'activité endocytaire indiquent clairement qu'à une échelle macroscopique, la protéine AdcA ne joue pas un rôle essentiel dans les processus endocytaires utilisés par l'amibe *Dictyostelium* au cours de sa vie végétative.

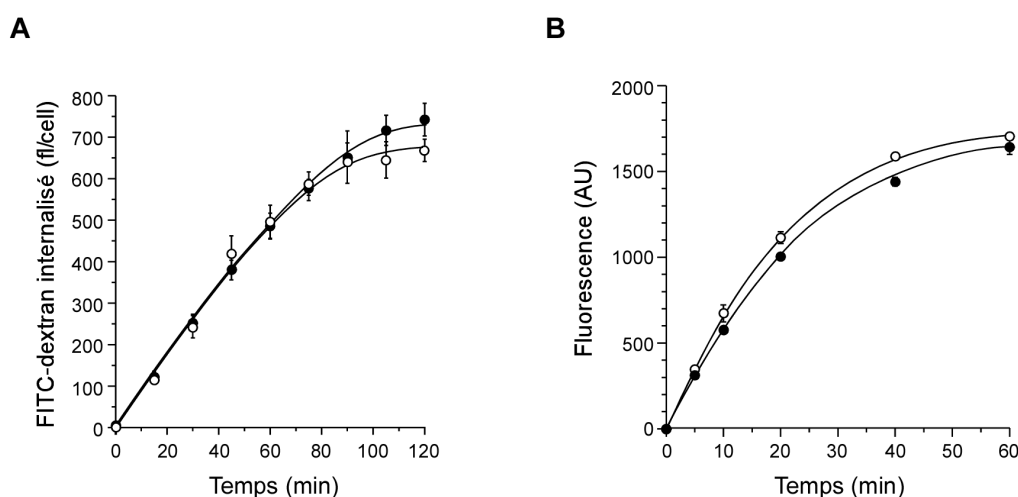


Figure 48 : Capacités pinocytaires et phagocytaires des cellules de la souche *adcA* nulle. A. Capacité pinocytaire en milieu nutritif des souches WT (○) et *adcA* nulle (●) suivie à l'aide du marqueur de phase fluide FITC dextran. B. Capacité phagocytaire des souches WT (○) et *adcA* nulle (●) suivie par FACS à l'aide de billes fluorescentes Fluoresbrite® de 1 µm de diamètre.

D. L'inactivation d'*adcA* conduit à un défaut dans la voie de recyclage depuis les endosomes

Malgré l'absence de défauts majeurs au niveau de l'activité endocytaire, nous avons poursuivi la caractérisation du trafic endocytaire dans le mutant *adcA* nul par une analyse à l'échelle microscopique en suivant le devenir de différents marqueurs de la voie endo-lysosomale. En particulier, nous nous sommes intéressés à deux protéines : le transporteur de cuivre potentiel p80 (voir Figure 28) et la protéine p25, un marqueur de la voie de recyclage entre les endosomes précoces et la membrane plasmique dont l'identité n'est pas connue mais dont le comportement le long de la voie endocytaire a été caractérisé grâce à un anticorps monoclonal généré dans le laboratoire de P. Cosson (Genève) (Ravanel *et al.*, 2001; Charette *et al.*, 2006).

Dans la souche parentale comme dans la souche *adcA* nulle, la protéine p80 suivie grâce à l'anticorps H161 est présente à la membrane plasmique et sur la voie endocytaire avec un enrichissement sur quelques compartiments de grosse taille, vraisemblablement des post-lysosomes (Figure 49). La protéine p25 en revanche ne présente pas une distribution similaire dans les deux contextes génétiques. Dans la souche KAx-3, et comme attendu, la protéine p25 est présente à la membrane plasmique et sur une grappe périnucléaire de petites vésicules caractérisées par l'équipe de P. Cosson comme des vésicules de recyclage en provenance des endosomes précoces (Charette *et al.*, 2006)(Figure 49). La protéine p25 est également

retrouvée de façon très occasionnelle sur des macropinosomes, un événement très transitoire au cours du transit de p25 entre la membrane plasmique et les compartiments de recyclage et donc peu fréquemment visible sur les immunofluorescences. Dans le mutant *adcA* nul, le marquage de la membrane plasmique est maintenu ainsi que celui des vésicules de recyclage mais on remarque également un marquage beaucoup plus fréquent des vésicules de plus grande taille. Ces compartiments sont positifs pour p80 alors que les vésicules de recyclage ne le sont pas, suggérant une nature macropinocytaire (Figure 49).

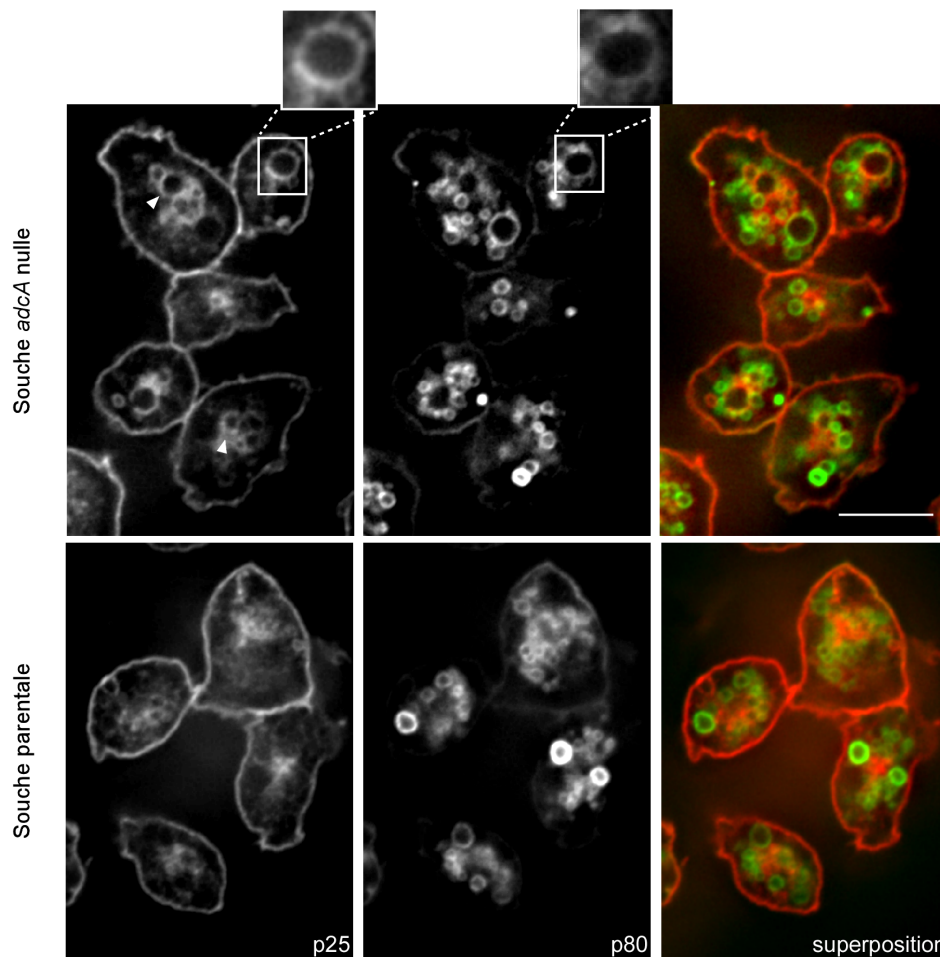


Figure 49: Le mutant *adcA* nul présente un défaut de recyclage précoce. Des cellules de la souche parentale et *adcA* nulle sont fixées en méthanol à -20°C et traitées pour une visualisation par immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal anti-p25. Après incubation avec un anticorps anti-souris marqué au Cy3, les cellules sont marquées avec l'anticorps monoclonal anti-p80 marqué préalablement à l'Alexa488. Des sections optiques sont enregistrées tous les $0,250\ \mu\text{m}$ et déconvoluées grâce au logiciel Axiovision de Zeiss. Une section en z médiane est montrée. Une vésicule positive pour les deux marqueurs p25 et p80 dans le mutant *adcA* nul est agrandie dans les panneaux du haut. La barre d'échelle représente $8\ \mu\text{m}$.

La quantification des macropinosomes positifs pour p25 (comptage sur 100 cellules) indique que le mutant *adcA* nul possède beaucoup plus de macropinosomes p25-positifs et de plus grande taille que la souche parentale et pointe donc en faveur d'un rôle d'AdcA dans le processus de recyclage précoce (Figure 50).

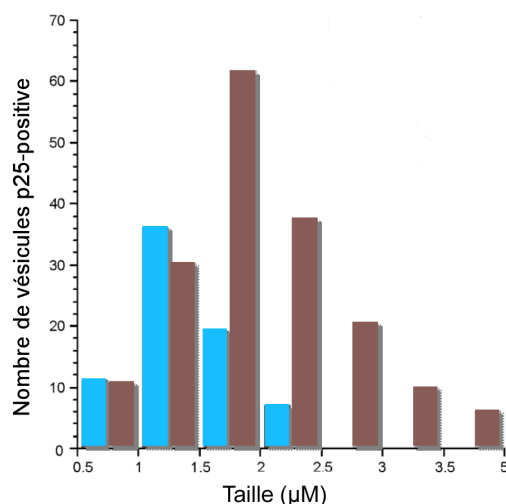


Figure 50 : Quantification des macropinosomes p25-positifs. Histogramme du nombre de macropinosomes en fonction de leur taille. Les macropinosomes de 100 cellules sont dénombrés et mesurés dans la souche parentale (barres bleues) et la souche *adcA* nulle (barres brunes).

Deux hypothèses peuvent expliquer l'observation de grosses vésicules p25-positives dans le mutant *adcA* nul :

1) la formation des vésicules de recyclage est dérégulée et les vésicules présentent une taille plus importante. Cette hypothèse est peu plausible car le mutant *adcA* nul présente toujours la grappe de vésicules de recyclage périnucléaires, comme la souche parentale et par ailleurs, ces grosses vésicules sont p80-positives alors que les endosomes de recyclage ne le sont pas.

2) le temps de résidence de p25 sur les macropinosomes est plus important que la normale, du fait éventuellement d'un tri vers les vésicules de recyclage moins efficace ou d'une cinétique de formation des vésicules de recyclage ralentie. Cette hypothèse est en accord avec un marquage p80-positif puisque p80 est présent sur l'ensemble de la voie endocytaire.

Afin de valider ce phénotype, des essais de complémentation avec la protéine AdcA_{GFP} ou AdcA_{myc} ont été réalisés. Malheureusement, la réintroduction des protéines entières dans le

mutant *adcA* nul ne restaure pas le phénotype parental. Plusieurs raisons peuvent être envisagées :

1) l'inactivation du gène *Dd-adcA* s'est accompagnée d'une autre mutation responsable du phénotype observé. Cette hypothèse est peu probable dans la mesure où le même phénotype a été retrouvé dans plusieurs des mutants *adcA* nuls que nous avons générés.

2) le niveau d'expression d'AdcA_{GFP} ou AdcA_{myc} bien plus élevé que celui de la protéine endogène est incompatible avec un fonctionnement normal de la protéine en termes de partenaires ou de régulateurs.

3) l'étiquette C-terminale de AdcA interfère avec la fonction d'AdcA en masquant un site essentiel pour la fonction d'AdcA, en empêchant la protéine d'adopter la même conformation que la forme endogène, ou encore en gênant son interaction avec certains partenaires. L'utilisation de la protéine étiquetée en N-terminal par la RFP devrait permettre de valider ou non cette hypothèse.

PARTIE IV. RECHERCHE DE PARTENAIRES D'AdcA

Afin d'intégrer AdcA dans une voie de signalisation, nous avons cherché à identifier des partenaires de la protéine. L'analyse de la séquence peptique d'AdcA nous a amené à tester de façon ciblée l'interaction avec diverses protéines du trafic endocytaire. En parallèle, deux approches non-informées ont été utilisées : un crible double-hybride et des expériences de pull-down.

I. Approche informée

A. La clathrine

Les β -arrestines participent à l'internalisation de récepteurs membranaires via le recrutement de divers acteurs de la machinerie endocytaire dont la clathrine. La liaison à la clathrine est assurée par une « boîte clathrine » localisée dans l'extrémité C-terminale des β -arrestines : ³⁷⁶LIELD³⁸⁰ pour la β -arrestine 1 et ³⁷³LIEFD³⁷⁷ pour la β -arrestine 2. La protéine AdcA possède un site potentiel de liaison à la clathrine dans le domaine C du cœur arrestine : ⁴¹⁵LLELE⁴¹⁹. Nous avons donc testé la possibilité d'une interaction entre AdcA et la clathrine. Deux approches ont été mises en œuvre :

- des expériences de pull-down utilisant la protéine GST-AdcA_C contenant le domaine C du cœur arrestine (voir Tableau VIII) ou la protéine fusion GST-SSYLLELEC contenant la « boîte clathrine » putative d'AdcA.
- des expériences d'immunoprécipitation utilisant des anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la clathrine

Aucune des approches n'a permis de mettre en évidence une interaction entre AdcA et la clathrine.

B. La machinerie ESCRT

Plusieurs travaux récents ont mis en évidence une implication de la β -arrestine 2 ou d'une protéine homologue d'arrestine chez la levure avec des sous-unités de la machinerie ESCRT pour réguler le trafic intracellulaire de récepteurs à 7 hélices transmembranaires (Herrador *et*

al., 2010; Malik and Marchese, 2010). La machinerie ESCRT (**E**ndosomal **S**orting **C**omplex **R**equired for **T**ransport) est un ensemble de complexes hétéro-oligomériques (ESCRT 0-I-II-III) qui fonctionnent sur les endosomes où ils assurent la prise en charge de cargos membranaires ubiquitinés et les séquestrent dans des vésicules intraluminales en vue de leur dégradation intralysosomale après fusion des endosomes avec les lysosomes. Au sein du complexe ESCRT 0, la protéine Hrs assure le recrutement du complexe au niveau des membranes endosomales via son domaine FYVE. Elle assure également le recrutement de la machinerie ESCRT I via l'interaction du domaine UEV (ubiquitin-conjugating E2 enzyme variant) de Tsg101 (ESCRT I) avec un motif P(S/T)AP situé dans la région centrale de Hrs. Ce même motif est présent dans les protéines virales Gag des virus HIV et Ebola notamment et assure, de façon similaire à Hrs, le recrutement de Tsg101 et des partenaires associés sur le site du bourgeonnement viral.

Chez *Dictyostelium*, le laboratoire a mis en évidence la présence dans le génome amibien des différents composants de la machinerie ESCRT à l'exception des constituants STAM1/2 et Hrs du complexe ESCRT 0 (Mattei *et al.*, 2006). Tom1, une protéine avec un domaine VHS, un domaine GAT et un site de liaison à la clathrine participe à un complexe ESCRT 0 ancestral pour le tri de protéines ubiquitinées au niveau de MVB (Blanc *et al.*, 2009). De façon intéressante, le domaine Y de AdcA contient le tétrapeptide PSAP dans son extrémité C-terminale (Figure 16). Par ailleurs, en amont de ce motif, AdcA présente également un motif de type YPx(I/L) décrit comme site d'interaction avec la protéine Alix, un partenaire de la machinerie ESCRT.

L'interaction éventuelle de AdcA avec les protéines Alix et Tsg101 de *Dictyostelium* a été testée par co-immunoprécipitation. Ce travail a été facilité par l'existence au laboratoire d'anticorps polyclonaux spécifiques dirigés contre Dd-Alix et Dd-Tsg101 et des souches *alx* et *tsg101* nulles générés au cours de la thèse de S. Mattei.

La protéine AdcA endogène a été immunoprécipitée grâce à l'anticorps AcC-AdcA dans la souche parentale KAx-3 et la présence de Tsg101 et d'Alix testée par Western blot. La souche *adcA* nulle a été utilisée comme contrôle. Inversement, les protéines Tsg101 et Alix ont été co-immunoprécipitées avec leurs anticorps spécifiques et la présence d'AdcA testée par Western blot avec l'anticorps AcC-AdcA. Les souches *tsg101* et *alix* nulles ont alors servi de contrôle.

Aucune de ces expériences n'a permis de mettre à jour la moindre interaction entre ces protéines laissant penser que, soit ces interactions n'existent pas, soit les conditions de co-immunoprécipitation ne sont pas appropriées à la détection des interactions.

II. Identification de partenaires par crible double-hybride

Afin d'identifier de nouveaux partenaires, nous avons opté dans un premier temps pour le criblage d'une banque d'ADNc de *Dictyostelium* par la technique du double-hybride en système levure. Nous avons utilisé le système *LexA* de Gyuris (Gyuris *et al.*, 1993) dans lequel le domaine de liaison à l'ADN est fourni par la protéine *LexA* de *E. coli* qui se lie aux séquences opératrices *LexA* et le domaine d'activation est un peptide de *E. coli* (B42) capable d'activer la transcription chez la levure. Les vecteurs pLexA (sélection His) et pB42AD (sélection Trp) permettent de fusionner ces domaines à l'ADNc de la protéine appât et aux ADNc de la banque respectivement. Deux gènes rapporteurs de l'interaction et sous le contrôle des séquences opératrices *LexA* sont utilisés : *lacZ* (porté par le vecteur pSH18-34, sélection Ura) et *leu2* (intégré dans le génome), le premier permettant l'expression de la β -galactosidase, le deuxième la croissance de la souche de levure *leu⁻* sur un milieu sans leucine.

A. Construction et test de l'appât

Pour ce crible double-hybride, nous avons choisi d'utiliser comme appât le cœur arrestine d'AdcA. Ce domaine a été étendu à la région riche en prolines **PSQPPGTPLPP** juste en aval du cœur arrestine qui inclut plusieurs sites potentiels d'interaction avec des protéines à domaine SH3. La construction utilisée qui s'étend de l'acide aminé 140 à l'acide aminé 460 a été sous-clonée dans le vecteur pEG202 (pLexA-NCPxxP) et testée pour son expression dans la levure

La souche de levure EGY48 a donc été transformée avec le vecteur pSH18-34 permettant l'expression de *lacZ* et pLexA-NCPxxP, sélectionnée sur milieu Glu-UH. Après sélection, cinq clones ont été testés pour leur niveau d'expression de la protéine appât par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-lexA (Santa Cruz) (Annexe 1). Le niveau d'expression étant relativement homogène dans les différents clones, le clone 4 a été conservé de façon arbitraire pour les étapes suivantes (Figure 51). Nous avons vérifié que l'appât seul n'activait pas les gènes rapporteurs *lacZ* et *leu* puis transformé le clone 4 avec la banque d'ADNc de

Dictyostelium (R. Firtel, UCSD). La sélection s'est faite sur milieu GAL-UHTL et les interactions ont été par la suite confirmées sur GAL-UHTX-gal.

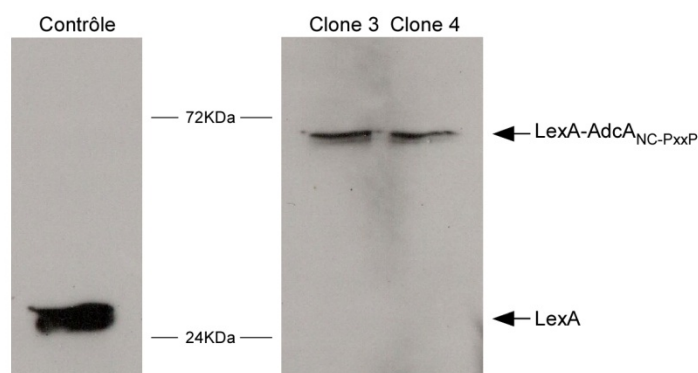


Figure 51 : Contrôle de l'expression de l'appât AdcA-NC. Les protéines extraites d'un lysat de levure exprimant la protéine LexA en fusion ou non avec le domaine NC de AdcA sont analysées en western blot avec un anticorps anti-LexA (Santacruz). Le clone 4 a été sélectionné.

B. Analyse sommaire des clones positifs

N° accession	Identité	Caractéristiques	Nombre d'identification
DDB0191152	NcfA	Facteur d'activation des NADPH oxydases. Domaines TPR, WW	3
DDB0188214	inconnue	Prédiction d'un site kinase et d'un domaine « coiled-coil »	1
DDB0231651	Prespore factor		1
DDB0191101	ArfA	Protéine G	1
DDB0237763	inconnue	F-box, cullin	1
DDB0233885	polyUb4		2
DDB0214925	UbqB/L40		2
DDB0237745	Deubiquitinase		1
DDB0232940	CAMkinase	Kinase	1
DDB0205575	InsPhosphatase 3	SAC	1
DDB0235326	Rab GAP	TBC	1

Tableau IX : Tableau récapitulatif des interactants obtenus dans un crible double-hybride

Une vingtaine de clones positifs a été obtenus. L'ADNc extrait de ces clones a été partiellement séquencé afin d'identifier le gène correspondant dans la banque Dictybase (<http://dictybase.org/tools/blast>). La liste des interactants obtenus dans ce crible est présentée dans le Tableau IX.

Parmi les 11 séquences obtenues, trois correspondent à des protéines dont la présence n'est pas facilement explicable : NcfA, un facteur cytosolique activateur de la NADPH oxydase ; une protéine inconnue à domaine en torsade d'hélices ; un facteur préspore.

Les autres candidats s'inscrivent, par analogie avec ce qui est connu pour les arrestines de mammifères, dans une logique fonctionnelle. On retrouve quatre protéines reliées à l'ubiquitination/dés-ubiquitination des protéines, la petite protéine G ArfA, une Rab GAP, une kinase de la famille des CAMkinases et une phosphatidyl phosphatase SAC. Dans la suite, seule l'interaction de la protéine ArfA avec AdcA a été étudiée plus en détail.

C. Caractérisation de l'interaction AdcA-ArfA

ArfA appartient à la famille des petites protéines G qui regroupe des protéines intervenant dans la transduction du signal, l'organisation du cytosquelette ou encore le trafic vésiculaire. Ces protéines peuvent être soit liées à une molécule de GTP (forme dite active) ou bien de GDP (forme inactive). Cette interaction avec le GDP ou le GTP est régulée par des partenaires de ces protéines que sont les GEFs (facteurs d'échange nucléotidique) qui déstabilisent l'interaction de la petite protéine G avec le GDP et permettent la liaison du GTP, ou encore les GAPs (GTPase Activating Proteins) qui stimulent l'activité GTPasique de la protéine G et permettent son retour à une forme inactive (Figure 52).

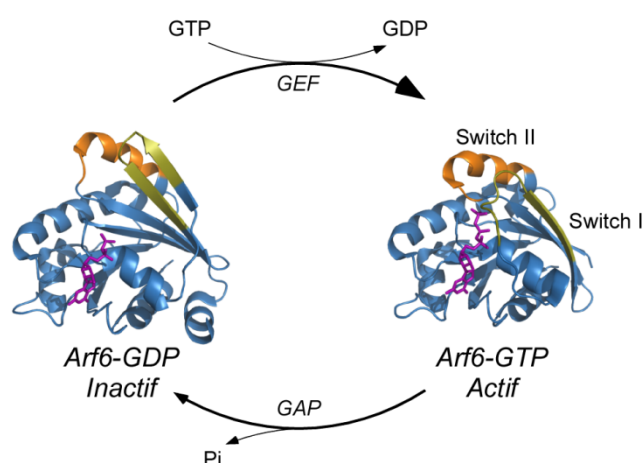


Figure 52: Cycle d'activation de la protéine Arf6. Arf6 comme toutes les petites protéines G cycle entre une conformation inactive liant le GDP et une conformation active en liant le GTP. L'échange de nucléotides est catalysé par un facteur d'échange, GEF, et l'hydrolyse du GTP est stimulée par un facteur d'activation GAP. Un changement de conformation de la molécule accompagne l'échange de nucléotides

1. Caractéristiques de la protéine ArfA

La protéine ArfA de *Dictyostelium* possède une forte homologie avec les protéines de mammifère Arf1 (85 % identité et 90 % d'homologie) et Arf6 (64% identité et 82% d'homologie). Les protéines Arf1 et Arf6 sont décrites pour intervenir dans des aspects de trafic membranaire. Elles sont localisées majoritairement sur les membranes des compartiments intracellulaires, notamment l'appareil de Golgi pour Arf1 et plutôt la membrane plasmique pour Arf6. Le rôle d'Arf1 se situe plus particulièrement au niveau de la formation de vésicules qui vont transiter à travers le Golgi. Arf6 quant à elle intervient dans l'internalisation de la membrane plasmique mais également au niveau du recyclage de membrane des endosomes vers la membrane plasmique. Il a été montré que Arf6 est capable d'interagir avec les β -arrestines.

La protéine ArfA possède un pI quasiment identique à celui de Arf1 (6,4 pour Arf1, 9,04 pour Arf6 et 6,1 pour ArfA) et la présence d'un motif MxxE laisse envisager une localisation golgienne (Figure 53). Cependant, son identification comme partenaire de AdcA laisse plutôt penser à un rôle plus proche de celui de la protéine Arf6 qui agit au niveau de la formation des endosomes et participe à leur recyclage à la membrane plasmique. ArfA étant le seul membre de la famille Arf (Arf1 à Arf6) présent chez *Dictyostelium*, elle pourrait couvrir les fonctions de différentes Arfs de mammifères.

A

ARFA	1	MGLAFGKLF	SRFGKKDMRILMVGLDAAGKTTILYKCLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEFKNI	61
H-ARF1	1	MGNIFANLFKGL	FGKKEMRILMVGLDAAGKTTILYKCLKLGEIVTTIPTIGFNVETVEYKNI	61
H-ARF6	1	---MGKVL	SKIFGNKEMRILMLGLDAAGKTTILYKCLKLQSVTTIPTVGFNVETVTYKNV	57
<div style="text-align: center;"> Switch I H H M x x E </div>				
ARFA	62	NFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDSDNRERI	QEACDELT	122
H-ARF1	62	SFTVWDVGGQDKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDSDNRERV	NEAREELMRMLA	122
H-ARF6	58	KFNVDVGGQDKIRPLWRHYTGQGLIFVVDCA	DRDRIDEARQELHRI	118
<div style="text-align: center;"> Switch II </div>				
ARFA	123	VF	CNKQDLPNAMSVAEVTDKLN	182
H-ARF1	123	VF	FANKQDLPNAMNAAEITDKLGLHSLRHRNWWYI	181
H-ARF6	119	I	FANKQDLPDAMKPH	175

B

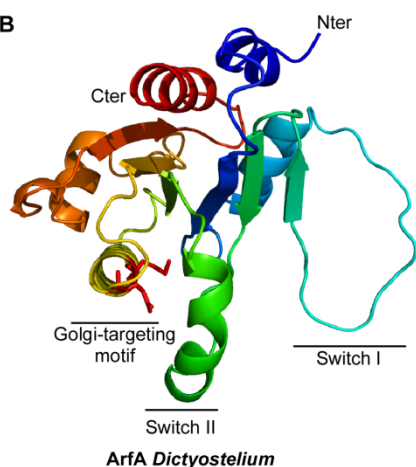


Figure 53 : ArfA de Dictyostelium est un homologue d'Arf1. **A.** Alignement des séquences d'ArfA, Arf1 et Arf6 généré avec le logiciel ClustalW et visualisé à l'aide du logiciel Jalview. L'intensité du bleu indique le degré de conservation entre les résidus des différentes protéines. Comme Arf1, ArfA possède un point isoélectrique quasi-neutre et un motif MxxE de localisation à l'appareil de Golgi. **B.** La structure tridimensionnelle d'ArfA a été modélisée à l'aide du logiciel en ligne PHYRE sur la structure cristalline d'Arf1 et visualisée avec le logiciel PyMol.

2. ArfA interagit avec le domaine C du cœur arrestine

Dans un premier temps, l'interaction de AdcA avec ArfA a été validée par une approche de pull-down. La protéine ArfA a été exprimée sous forme recombinante et étiquetée en C-terminal avec une étiquette poly-histidine (ArfA_{His}). Côté AdcA, nous avons cherché à exprimer le cœur arrestine de AdcA sous une forme fusionnée à la GST. Face à l'insolubilité de ce domaine malgré des essais multiples d'expression en BL21-DE3 (modifiant la température et les conditions d'induction), nous avons limité nos essais d'interaction au domaine C du cœur arrestine exprimé en fusion avec la GST, GST-AdcA_C (Figure 54A). Après purification sur billes de glutathion-Sepharose, les protéines purifiées sont maintenues sur les billes et mises en présence de la protéine ArfA_{His} en tampon d'interaction contenant 0,1 mM de GTPγS, 0,1 mM de GDPβS ou aucun nucléotide rajouté. La GST seule a été utilisée comme contrôle.

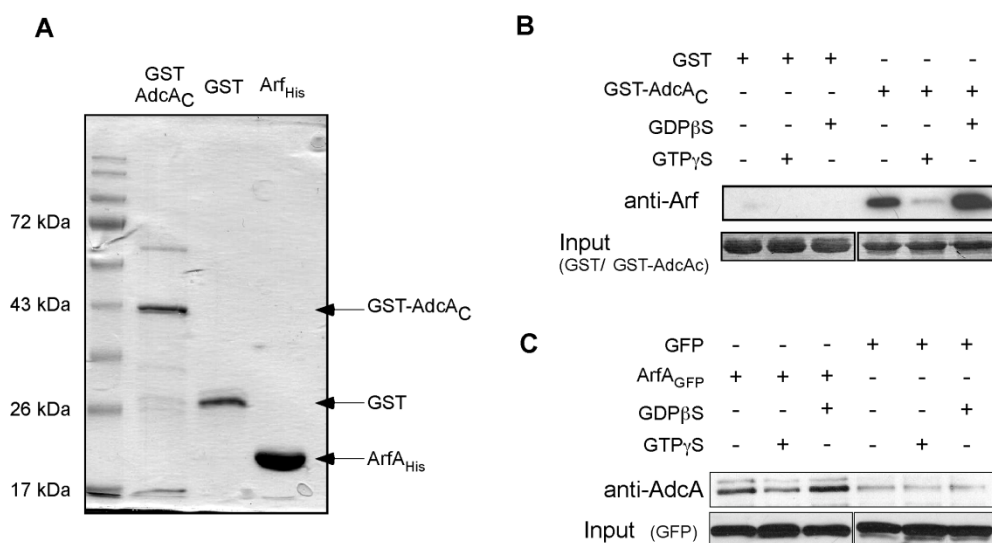


Figure 54 : Le domaine C arrestine d'AdcA interagit avec ArfA. **A.** Analyse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes du domaine arrestine-C de AdcA fusionné à la GST (GST-AdcA_C) purifié sur une colonne de glutathion-Sepharose (puits 1), de la GST seule (puits 2) et de la protéine ArfA portant une étiquette hexa-histidine à son extrémité C-terminale purifiée sur une colonne de Ni-NTA immobilisé (puits 3). **B.** Pull-down réalisé avec la protéine GST-AdcA_C et la GST comme contrôle fixées aux billes de glutathion-Sepharose. Les billes sont mises en incubation pendant 1 h à 4°C avec la protéine ArfA_{His} purifiée dans un tampon d'interaction contenant 100 μM de GDPβS ou 100 μM de GTPγS ou bien sans nucléotide. Après lavages, la présence d'ArfA associée aux billes est analysée par Western blot avec l'anticorps commercial EP442Y anti-Arf1 (Epitomics). **C.** Immunoprécipitation réalisée sur les souches KAx-3 co-exprimant RFPAdcA et ArfA_{GFP} ou RFPAdcA et la GFP seule à l'aide d'anticorps anti-GFP en présence de 100 μM de GDPβS ou 100 μM de GTPγS ou bien sans nucléotide. La présence de RFPAdcA dans les fractions immunoprécipitées est analysée par Western blot avec l'anticorps anti-AdcA AcC-AdcA.

La Figure 54B montre clairement que la protéine ArfA interagit de façon spécifique avec le domaine C du cœur arrestine d'AdcA et que cette interaction se fait principalement avec la forme GDP de ArfA. La présence de GTPγS inhibe de façon nette cette interaction.

Des expériences de co-immunoprécipitation utilisant la protéine ArfA étiquetée avec la GFP en C-terminal confirment ces résultats. En effet, l'immunoprécipitation de ArfA_{GFP} dans une souche KAx-3 co-exprimant ArfA_{GFP} et RFPAdcA à l'aide d'anticorps anti-GFP s'accompagne d'une co-immunoprécipitation de RFPAdcA (Figure 54C). Une quantité plus importante de RFPAdcA est observée en l'absence de nucléotide ou en présence de GDPβS (Figure 38C). L'utilisation de la souche co-exprimant GFP et RFPAdcA comme contrôle indique que, dans ces conditions d'immunoprécipitation, une fraction constante de RFPAdcA interagit avec la GFP quels que soient les nucléotides ajoutés. Ce niveau basal est comparable à celui obtenu en présence de GTPγS dans la souche co-exprimant ArfA_{GFP} et RFPAdcA et suggèrent que l'interaction est spécifique des conditions « GDPβS » et « sans nucléotides ».

Les résultats de pull-down et de co-immunoprécipitation confirment donc que AdcA et ArfA sont capables d'interagir via le domaine C du module arrestine et indiquent que l'interaction se fait de façon nucléotide-dépendante.

3. Localisation subcellulaire de la protéine ArfA

Aucun travail de caractérisation spécifique de ArfA n'ayant été publié dans la littérature, il a été nécessaire à ce stade du travail de définir la localisation subcellulaire d'ArfA en vue de déterminer le site d'action du couple AdcA-ArfA. Ce travail a été réalisé sur la souche KAx-3 exprimant ArfA_{GFP}.

L'observation au microscope des cellules KAx-3 ArfA_{GFP} après fixation en 4% PFA indique que la protéine ArfA_{GFP} est localisée dans le cytosol, très légèrement à la membrane plasmique et essentiellement dans une zone périnucléaire. Ce patch correspond à l'appareil de Golgi, comme indiqué dans une expérience de co-marquage avec l'anticorps 1/39, un marqueur avéré du Golgi (Gräf *et al.*, 1999) (Figure 55A). De façon attendue pour une localisation golgienne, l'addition dans le milieu de 5% DMSO connu pour dissocier l'appareil de Golgi de façon transitoire (Weiner *et al.*, 1993) conduit à un éparpillement du marquage ArfA_{GFP}. Le patch périnucléaire d'ArfA est dissocié dans les premières minutes qui suivent le traitement et se reconstitue en 45 minutes malgré le maintien du DMSO dans le milieu (Figure 55B), conformément au comportement de l'appareil de Golgi. L'observation par vidéomicroscopie de cellules non fixées surexprimant ArfA_{GFP} démontre la présence de ArfA sur des structures très mobiles incluant des tubules et des vésicules. On voit en particulier des vésicules positives pour ArfA s'éloigner de l'appareil de Golgi sur des tubules ArfA-positifs, s'arrêter et revenir vers leur point d'origine (Figure 55D).

Dans une souche co-exprimant ArfA_{GFP} et RFPAdcA, une co-localisation est observée au niveau de la membrane plasmique, les deux protéines étant toutes les deux présentes faiblement à la membrane plasmique. En ce qui concerne les compartiments endocytaires, on peut noter que les endosomes positifs pour AdcA ne sont pas positifs pour ArfA. En revanche, plusieurs d'entre eux sont dans un voisinage proche du réseau golgien marqué par ArfA (Figure 55C).

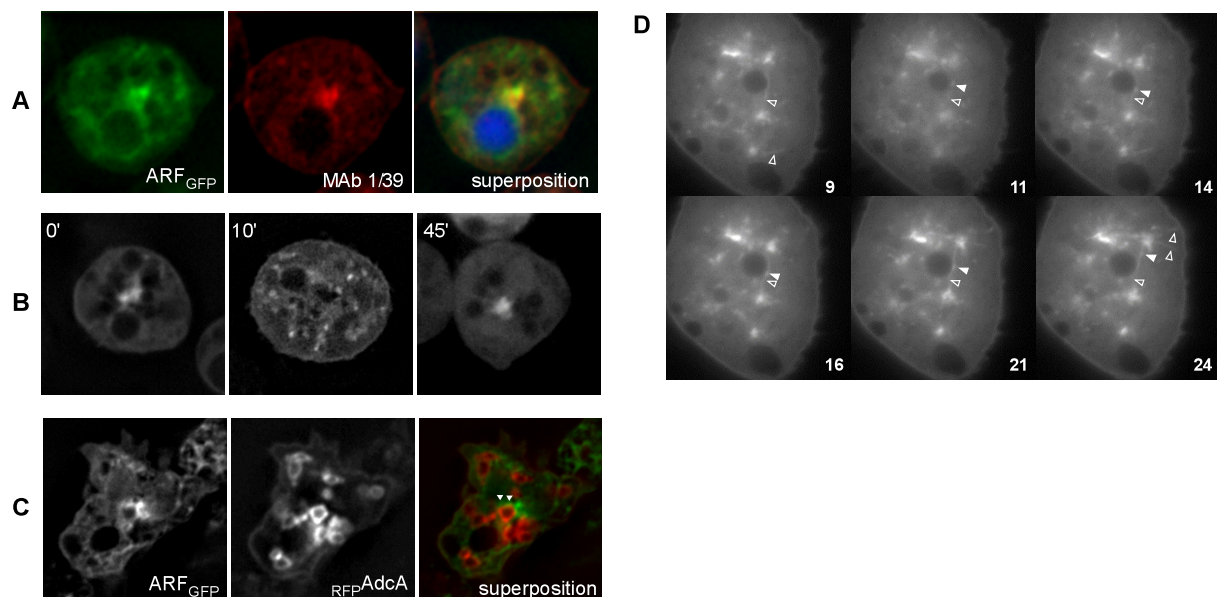


Figure 55: Localisation subcellulaire de la protéine ArfA de *Dictyostelium*. ArfA est localisée sur l'appareil de Golgi et sur un réseau tubulaire. **A.** Des cellules surexprimant ArfA_{GFP} sont fixées et observées pour le marquage GFP et de l'anticorps 1/39 dirigé contre l'appareil de Golgi. Les noyaux sont colorés au DAPI. **B.** Des cellules surexprimant ArfA_{GFP} sont mises à adhérer dans une chambre Labtek et observées sans fixation avec un filtre GFP (0'). Du DMSO est alors ajouté à une concentration finale de 5% et les cellules sont observées après 10 min (10') ou 45 min (45'). **C.** Des cellules exprimant à la fois ArfA_{GFP} et RFP-AdcA sont observées pour les deux fluorescences verte et rouge. **D.** Des cellules non fixées surexprimant ArfA_{GFP} sont mises à adhérer dans une chambre Labtek et observées en continu avec 4 images par seconde. Des images individuelles correspondant aux prises indiquées sont présentées. Des tubules positifs pour ArfA sont indiqués par des têtes de flèche vides. La tête de flèche pleine dans les images 11-24 montre une vésicule ArfA-positive associée à un tubule ArfA-positif, qui s'éloigne d'abord de l'appareil de Golgi (direction centrifuge) puis reverse son mouvement (direction centripète).

Ces résultats ne permettent pas actuellement de déterminer où les protéines AdcA et ArfA interagissent dans la cellule. Il est possible que l'interaction entre ces deux partenaires soit extrêmement transitoire et ne facilite pas une observation par microscopie. L'expression constitutive d'une forme mutante de ArfA constitutivement active et d'une forme dominante négative se sont révélées létales. L'utilisation d'un système d'expression inducible permettant l'expression transitoire de ces mutants de ArfA pourrait permettre de stabiliser l'interaction avec AdcA et de la visualiser en microscopie.

III. Recherche de partenaires par co-immunoprécipitation

Une autre recherche de partenaires a été réalisée par des approches de pull-down. Dans ce cadre, plusieurs souches ont été utilisées (Tableau X). Les cellules ont été lysées en PBS contenant 1% NP40 et le surnageant post-nucléaire mis en présence des anticorps appropriés mentionnés dans le Tableau X. Après lavages, les protéines co-immunoprécipitées ont été séparées par SDS-PAGE, colorées au nitrate d'argent puis identifiées par spectrométrie de

masse (Collaboration avec le laboratoire EDyP de l'iRTSV). Les analyses MS-MS ont été faites, soit sur la totalité des protéines après une migration de quelques minutes sur gel, soit sur des protéines spécifiques visiblement absentes dans le contrôle et découpées du gel.

Souche utilisée	Souche contrôle	Anticorps utilisé
<ul style="list-style-type: none"> • KAx-3 • KAx-3 AdcA_{GFP} • KAx-3 AdcA_{myc} 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>adcA</i> nulle • KAx-3 • KAx-3 	<ul style="list-style-type: none"> • AcC-AdcA • Anti-GFP • Anti-myc

Tableau X : Souches et anticorps utilisés pour les expériences de pull-down

Cette approche a conduit au pull-down d'un grand nombre de protéines non retrouvées dans les contrôles, qui semblent donc spécifiques de AdcA (Figure 56).

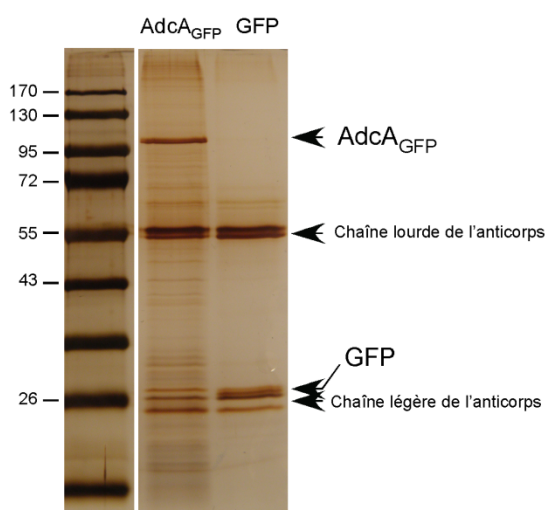


Figure 56 : Pull-down de partenaires de AdcA_{GFP}. Les protéines GFP et AdcA_{GFP} sont immunoprécipitées avec des anticorps anti-GFP. Après lavages, les protéines présentes dans l'immunoprécipitat sont séparées par SDS-PAGE et colorées au nitrate d'argent.

Néanmoins, seulement 4 protéines ont été retrouvées de façon systématique dans l'ensemble des expériences (Tableau XI) :

- AdcA : sa présence dans les expériences utilisant les souches KAx-3 AdcA_{GFP} et KAx-3 AdcA_{myc} est en accord avec la capacité d'AdcA à former des homo-oligomères (voir Partie II).

- FrnC : cette protéine possède en position centrale un domaine FRM homologue à celui retrouvé dans la moésine ou la taline et une queue C-terminale incluant de nombreux motifs LRR (*leucine-rich repeat*). La plupart des protéines à domaine FRM sont capables d'interagir avec des partenaires membranaires et en assurent leur connexion au cytosquelette d'actine. Une analyse rapide de la séquence peptidique de FrnC ne permet pas de mettre en évidence avec certitude des sites de liaison à l'actine, contrairement à des protéines comme la taline et la moésine. En revanche, elle représente un candidat intéressant pour recruter ou réguler des partenaires membranaires éventuels de AdcA d'autant que les travaux de Clémence Habourdin, stagiaire de M2 au laboratoire, ont confirmé l'interaction entre AdcA et l'extrémité N-terminale de FrnC.
- PPK1 : la polyphosphate kinase PPK1 de *Dictyostelium* est la seule protéine eucaryote homologue en séquence des PPK1 bactériennes. Elle permet la synthèse, à partir d'ATP, de chaînes de polyphosphates (polyP) de plusieurs centaines d'unités phosphate en réponse au stress et au jeûne. Elle est sans doute associée aux acidocalcisomes, des vacuoles riches en polyP et en Ca^{2+} et est responsable des flux calciques à travers les membranes de cet organite. Des mutants de PPK1 ont des défauts de développement, de sporulation, de prédation et de cytokinèse (Zhang *et al.*, 2007).
- Acyl-CoA oxydase : Cette isoforme est l'une des 8 acyl-CoA oxydases de *Dictyostelium* responsables de la conversion par beta-oxydation des acides gras. Ces enzymes participent à 3 voies métaboliques : le métabolisme des acides gras qui par beta-oxydation sont convertis en acétyl-CoA, la biosynthèse des acides gras polyinsaturés et la signalisation de PPAR. Elles fonctionnent dans les peroxysomes. La raison de l'interaction de l'acyl-CoA oxydase avec AdcA n'est pas claire.

De façon intéressante, la protéine ArfA a été retrouvée dans une seule expérience, validant son interaction avec AdcA mais suggérant néanmoins une interaction fugace.

Protéines	Gene ID	Description	Score	Nombre de peptides identifiés
AdcA	DDB_G0292924	Cette thèse	1291	25
Acyl-CoA oxydase	DDB_G0286669	Catalyse la réaction $\text{acyl-CoA} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{trans-2,3-dehydroacyl-CoA} + \text{H}_2\text{O}_2$	1108	18
PPK1 = PolyPhosphate Kinase	DDB_G0293524	Catalyse la synthèse et la dégradation de longues chaînes de polyphosphate	635	12
FrmC	DDB_G0289313	Par analogie, est susceptible de médier l'interaction de protéines cytoplasmiques avec la membrane plasmique	224	3

Tableau XI : Identification par spectrométrie de masse des partenaires d'AdcA précipités par pull-down

DISCUSSION PERSPECTIVES

DISCUSSION

Toutes les cellules sont l'objet d'une régulation fine de la signalisation intracellulaire en aval de récepteurs de la membrane plasmique. Les arrestines/ β -arrestines jouent un rôle clé dans cette régulation, rôle qui exploite leur capacité de plate-forme de liaison de partenaires variés. Leur recrutement sur un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) activé suite à la fixation d'un agoniste permet de réguler la signalisation en interférant avec la liaison des protéines G aux récepteurs, en déclenchant l'internalisation du récepteur et en servant éventuellement de plate-forme de signalisation secondaire.

L'essentiel des données sur les arrestines a été collecté avec des cellules d'eucaryotes supérieurs, avec des résultats originaux et novateurs obtenus chez la drosophile. Les modèles unicellulaires de levures (*S. cerevisiae*) ou de champignons (*Aspergillus nidulans*) ont été étudiés plus récemment et les rôles découverts pour des protéines apparentées aux arrestines de mammifères sortent de la vision dogmatique établie avec les seuls résultats de mammifères. Ces membres de la famille arrestine régulent des protéines intrinsèques de la membrane plasmique autres que des RCPG ou des fonctions cellulaires associées à des organites subcellulaires. Plus récemment, il a été montré que Vps26, une protéine qui n'est pas apparentée aux arrestines par sa séquence, possède cependant le même repliement que ces dernières. Vps26 sert d'échafaudage moléculaire dans le rétromère, un complexe multi-protéique qui intervient dans le trafic retrograde du récepteur mannose 6-phosphate entre l'endosome et l'appareil de Golgi. Enfin, une des protéines à domaine arrestine de mammifère contrôle l'état redox de la cellule en interagissant avec la thioredoxine. L'ensemble des protéines à domaine arrestine (séquence et repliement) a été regroupé dans une superfamille de protéines, le clan arrestine.

L'élargissement récent des fonctions attribuées aux protéines du clan des arrestines nous a incités à aborder le rôle de protéines ancestrales de cette famille chez un modèle biologique, *D. discoideum*, qui a divergé de la branche qui mène aux mammifères avant les levures, mais qui est beaucoup plus proche des mammifères que ne l'est la levure, suite une voie évolutive différente.

***Dictyostelium* possède un large répertoire de protéines à domaine arrestine**

La complétion en 2005 du séquençage et de l'assemblage du génome de *Dictyostelium* nous a permis d'établir le répertoire exhaustif de protéines à domaine arrestine.

Mises à part une protéine Vps26 ($1.e^{-108}$) et une protéine DSCR3 ($4.e^{-89}$) qui possèdent des scores élevés dans une comparaison BlastP avec les homologues humains, *Dictyostelium* possède six protéines à domaine arrestine (AdcA-F) dont les scores avec les arrestines humaines sont beaucoup moins flatteurs ($2.e^{-5}$) et pose la question de leur qualification comme arrestines authentiques. Tous les homologues de *Dictyostelium* sauf un ont les deux domaines PFAM N-arrestine et C-arrestine. Il existe une différence majeure entre les Adc de *Dictyostelium* et les arrestines/ β -arrestines authentiques de mammifères, à savoir la présence de part et d'autre du cœur arrestine des Adc d'extensions conséquentes organisées ou non selon les isoformes en domaines d'interaction protéine-protéine (SAM, MIT, LIM) ou protéine-lipide (FYVE, C2).

Dans mon travail de thèse, je me suis attaché principalement à la protéine AdcA qui possède un domaine FYVE d'interaction avec le phosphoinositide PI(3)P. De façon plus marginale, j'ai abordé l'étude de AdcD, une deuxième protéine à domaine arrestine avec un domaine FYVE et qui pourrait être redondante avec AdcA.

AdcA, une protéine à domaine arrestine avec un domaine de ciblage aux endosomes

La séquence de la protéine AdcA est originale si on la compare à celle d'une arrestine conventionnelle. Le cœur arrestine a une longueur tout à fait classique (environ 400 acides aminés) et est organisé en deux domaines N- et C-arrestine. Malgré une très faible conservation de la séquence en acides aminés, ce cœur arrestine peut être modélisé sur la structure cristalline de la β -arrestine. L'absence d'un cœur polaire chez AdcA suggère cependant un mécanisme de recrutement et d'activation différent de celui des β -arrestines. Les arrestines et protéines à domaine arrestine de mammifères ont récemment été classées en 2 catégories : les arrestines α porteurs de sites PPxY qui sont les sites de liaison d'ubiquitine ligases de type HECT et où on retrouve toutes les Adc ; les arrestines β dont la structure comprend une hélice α et qui comprennent les arrestines visuelles et β -arrestines. AdcA-F de

Dictyostelium n'ont pas de sites PPxY dans leur séquence, alors que le génome de *Dictyostelium* code pour des E3 ubiquitine ligases de type HECT, DDB_G0285063 par exemple. Par contre, la structure modélisée de AdcA-D présente une courte hélice α vers le N-terminal. D'après ces 2 critères, AdcA-E se classent dans le groupe des arrestines β et leur rôle pourrait être plus proche de celui des arrestines conventionnelles que des Adc de mammifères.

En amont du cœur arrestine, AdcA possède une triple répétition d'un domaine d'environ 30 acides aminés comportant 5 ou 6 histidines adjacentes et un domaine hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés qui, malgré les prédictions, ne forme pas un passage transmembranaire. Le cœur arrestine est prolongé en aval par un domaine FYVE, domaine de liaison hautement spécifique d'un lipide particulier enrichi sur les endosomes, le PI(3)P et une séquence terminale assez riche en tyrosines.

Cette structure qui inclut un domaine de ciblage aux endosomes est originale et va contraindre le rôle d'AdcA sur un compartiment intracellulaire endosomal. C'est une différence avec les arrestines vraies dont la liaison à un récepteur se fait à la membrane plasmique et qui vont accompagner ce récepteur jusqu'aux endosomes où elles exercent éventuellement leur fonction de plate-forme de signalisation secondaire.

Des homologues d'AdcA sont retrouvées essentiellement dans le règne des Amoebozoaires, plus précisément chez les Mycetozoa et les Archamoebae: *D. discoideum*, *D. purpureum*, *P. pallidum*, *E. histolytica* et *E. dispar*. De façon intéressante, un homologue d'AdcA est retrouvé dans une espèce qui n'est pas du tout reliée aux précédentes, *Micromonas pusilla*. *Micromonas* est une espèce picoplanctonique photosynthétique du groupe des prasinophytes. Ce sont des algues microscopiques (0,2 à 2 μ m), unicellulaires, primitives, ancêtre commun des algues vertes et de l'ensemble des plantes terrestres. Le fait de trouver une protéine structurée comme AdcA, avec une conservation des domaines additionnels, chez une algue suggère que ses homologues pourraient être conservés chez les plantes. La divergence de séquence importante entre arrestines et AdcA existe sans doute entre des homologues d'Adc de différentes espèces et explique sans doute l'échec de nos recherches de protéines à domaine arrestine chez les plantes.

AdcA, un marqueur des endosomes précoces

L'utilisation de constructions étiquetées d'AdcA (GFP, RFP, myc₂) a mis en évidence la localisation quasi-exclusive d'AdcA sur une sous-population d'endosomes sur des cellules non fixées. Cette observation faite sur des souches de surexpression a été validée sur cellules fixées sur la protéine endogène, à l'aide d'un anticorps généré pendant mon travail de thèse. Une investigation de l'état de maturation des endosomes porteurs d'AdcA, dans des expériences de pulse-chasse ou en utilisant des marqueurs de la voie endocytaire, permet de tirer plusieurs conclusions : 1- AdcA est enrichie massivement sur les endosomes, dès la fermeture de la coupe phagocytaire en un endosome précoce ; 2- ce recrutement d'AdcA se fait sur les macropinosomes et sur les phagosomes ; 3- ce recrutement se fait sur des vésicules formées grâce à un squelette d'actine et non de clathrine.

Le ciblage d'AdcA sur les endosomes précoces nécessite la présence du domaine FYVE. La délétion de ce domaine ou l'introduction d'une mutation qui réduit fortement l'affinité du domaine pour le PI(3)P rend cytosolique la protéine. Les autres domaines d'AdcA, le domaine riche en histidine, la séquence hydrophobe et la séquence riche en tyrosines peuvent être tronqués sans affecter la liaison vésiculaire AdcA et ne semblent donc pas jouer de rôle dans l'association membranaire de la protéine. Le domaine FYVE *per se* ou sous forme d'un dimère en série n'est pas suffisant pour lier le PI(3)P. Ceci est paradoxal étant donné la conservation de ce domaine et en particulier de tous les acides aminés de la signature de FYVE. Il faut noter l'absence dans le domaine FYVE d'AdcA de l'hélice α en amont qui permet, pour la protéine EEA1 notamment, la formation d'une torsade d'hélices et l'homodimérisation de la protéine. Une autre variation est la présence d'une alanine dans une boucle hydrophobe d'insertion dans la membrane (MIL) dans une position généralement occupée par une lysine. Or, la mutation de cette lysine en alanine diminue fortement l'affinité pour les endosomes des domaines FYVE. Le domaine FYVE d'AdcA n'est pas suffisant à l'association membranaire de la protéine, et d'autres déterminants semblent entrer en jeu. Les β -arrestines sont recrutées à la membrane plasmique à travers leur reconnaissance d'un récepteur activé et phosphorylé. Le cœur arrestine d'AdcA pourrait stabiliser l'interaction membranaire médiée par son FYVE, en interagissant avec la partie cytosolique d'une protéine intrinsèque.

La nature du cargo reconnu par AdcA est inconnue, même si nous avons des pistes sur un candidat possible, la protéine p25. Le signal de recrutement d'AdcA à la membrane est également inconnu. Le fait qu'AdcA soit recrutée sur les endosomes pendant la phagocytose et la macropinocytose ne dépendant pas -au moins pour la macropinocytose- d'un récepteur, activateur ou régulateur, élimine la possibilité d'un recrutement d'AdcA semblable à celui des β -arrestines sur un récepteur activé. Cependant, le recrutement d'AdcA ne se fait pas à la membrane plasmique où on pourrait trouver un récepteur activé, mais plus tard, une fois que la vésicule endosomale précoce est fermée, à un moment où la cellule doit trier et recycler vers la membrane plasmique un certain nombre de protéines. C'est là qu'il faudra chercher un cargo d'AdcA, un signal de recrutement et des partenaires dans la fonction envisagée, c'est à dire le recyclage de protéines membranaires vers la membrane plasmique.

Le domaine H, un domaine d'oligomérisation, un site de liaison des métaux ou un senseur de pH ?

Le domaine H, constitué d'une triple répétition d'une séquence conservée avec un cluster de 5 ou 6 histidines consécutives, est capable d'oligomériser en présence de métaux de transition. Parmi les métaux testés, le nickel est le meilleur candidat et sa concentration efficace pour induire l'oligomérisation est de l'ordre de 5 μ M. Le métal physiologique qui régule l'oligomérisation du domaine H n'est pas connu.

Une hypothèse alternative est que les histidines servent de senseur de pH. L'histidine est en effet le seul acide aminé avec un pK de la chaîne latérale dans la zone des pH physiologiques. La liaison à l'actine de l'hisactophiline, une autre protéine de *Dictyostelium* riche en histidines, est régulée par le pH cytosolique. A ce jour, on ne sait pas si le domaine H sert à l'homo-oligomérisation uniquement, ou s'il peut être engagé dans une hétéro-oligomérisation avec des partenaires de la protéine AdcA.

La protéine AdcA répond également à la présence de métaux par une oligomérisation dans des complexes de très haute masse moléculaire (jusqu'à 2 MDa). AdcA est au moins dimérique dans ces complexes, mais sa multiplicité exacte (de l'ordre d'un 20-mère d'après la taille du complexe) n'est pas établie du fait que les autres partenaires éventuels présents dans ce complexe restent inconnus.

L'état oligomérique des β -arrestines dépend de leur liaison à l'inositol hexakisphosphate (IP₆) (forme de stockage cytosolique tétramérique) ou au récepteur (forme activée monomérique associée à la membrane plasmique). Une telle régulation est tout à fait envisageable pour AdcA pour deux raisons : 1- *Dictyostelium* est sans doute l'organisme qui possède l'IP₆ en plus fortes concentrations, de l'ordre de 1 mM ; 2- les résidus positivement chargés qui déterminent les sites de haute et basse affinité des β -arrestines pour l'IP₆ sont parfaitement conservés chez AdcA. Cependant, les essais préliminaires réalisés ne laissent pas supposer une régulation de l'état oligomérique d'AdcA par l'IP₆.

Rôle physiologique de la protéine AdcA

L'invalidation de la protéine AdcA nous a renseignés quant à sa fonction dans la cellule. Comme attendu, le mutant *adcA* nul ne possède pas de défauts apparents dans les grandes voies d'entrée de nutriments, macropinocytose et phagocytose. Par contre, ce mutant nul présente un défaut de localisation d'un marqueur de la voie de recyclage, la protéine p25. Alors que chez le parent la protéine p25, présente à la membrane plasmique, est internalisée et rapidement triée dans des vésicules de recyclage péri-nucléaires, dans la souche *adcA* nulle, son temps de résidence avant recyclage sur les macropinosomes précoces semble allongé. L'allongement de son temps de résidence sur ces vésicules pourrait être la conséquence d'un défaut de tri vers les endosomes de recyclage dont AdcA serait l'un des acteurs.

De façon intéressante, ce défaut de recyclage de la p25 est aussi observé avec un mutant d'invalidation de la sous-unité μ du complexe adaptateur AP-3. L'hypothèse qu'AdcA fonctionne avec AP-3 est renforcée par le fait qu'ArfA, un partenaire d'AdcA, interagit aussi avec μ 3 (Bennett *et al.*, 2008).

Par contre, les sites d'interaction présents sur AdcA pour la clathrine ou la sous-unité Tsg101 du complexe ESCRT n'ont pas pu être validés dans nos expériences.

Partenaires de la protéine AdcA et mécanisme

Un des partenaires d'AdcA est la petite protéine G ArfA. ArfA est le seul membre amibien de la famille ARF, et sa séquence indique qu'elle a comme plus proche homologue la

protéine de mammifère Arf1, localisée sur l'appareil de Golgi. ArfA a une localisation multiple : légèrement présente dans le cytosol et à la membrane plasmique, elle est enrichie sur l'appareil de Golgi. De façon originale, nous avons montré qu'ArfA était aussi associée à des tubules qui convergent vers l'appareil de Golgi ainsi qu'à des vésicules qui se déplacent à partir de et vers l'appareil de Golgi. ArfA n'est cependant pas associée aux macropinosomes porteurs d'AdcA, mais la grappe golgienne est adossée à certains macropinosomes.

Même si le mécanisme n'est pas complètement clair, notre hypothèse actuelle est qu'AdcA fonctionne dans le recyclage précoce de protéines membranaires et que ce recyclage utilise la protéine G ArfA, sans doute pour le bourgeonnement à partir du macropinosome des vésicules de recyclage.

L'analyse par protéomique différentielle d'endosomes de la souche parentale et de la souche *adcA* nulle nous permettra, nous l'espérons, d'identifier quelques protéines membranaires cargos et éventuellement d'autres partenaires de la machinerie de tri et de proposer un mécanisme complet de recyclage précoce.

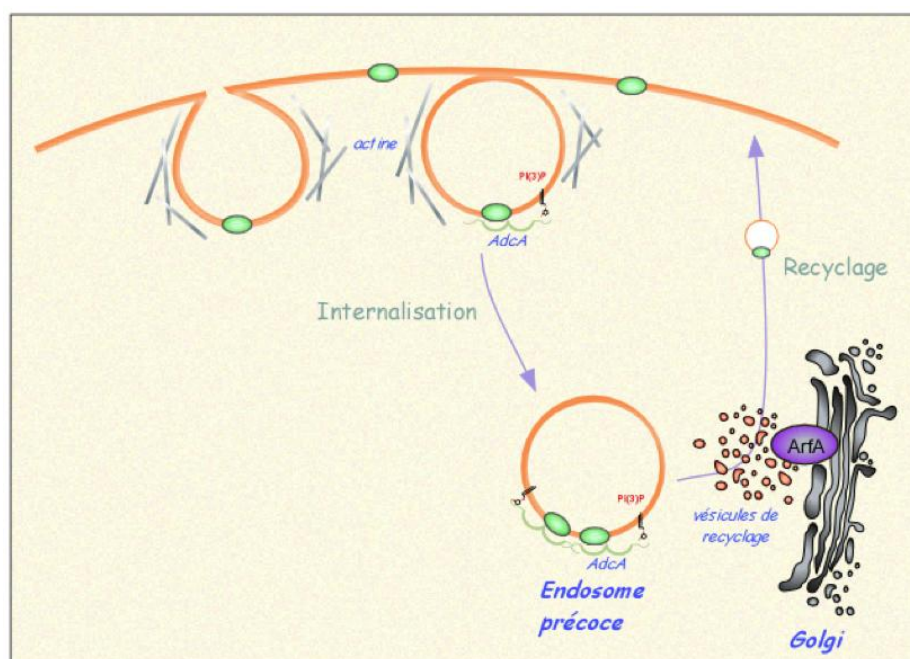


Figure 57 : Proposition d'un mécanisme modèle pour le fonctionnement de la protéine AdcA

PERSPECTIVES

Les perspectives ouvertes sont en continuité directe avec mon travail de thèse.

Le premier objectif est de compléter notre compréhension du rôle d'AdcA et passe par l'identification du(es) cargo(s) pris en charge par AdcA. La démarche s'appuiera sur une analyse protéomique différentielle. Nous avons vu qu'une des répercussions de l'inactivation d'*adcA* est l'allongement du temps de résidence de la protéine p25 sur le macropinosome. p25 est une protéine membranaire qui n'est caractérisée que par sa localisation sur les vésicules de recyclage et elle est un candidat plausible pour être pris en charge par AdcA. L'analyse protéomique des souches parentale et *adcA* nulle et leur comparaison permettront de déterminer l'ensemble des protéines dont la résidence sur les endosomes est modifiée par l'inactivation d'AdcA. Ce répertoire comprendra les cargos membranaires dont le trafic intracellulaire est médié par AdcA, mais peut également inclure des protéines de la machinerie d'endocytose ou de plate-forme de signalisation recrutés normalement par AdcA.

De nombreuses pistes ont été ouvertes par l'identification de partenaires d'AdcA. L'interaction d'AdcA avec la protéine FrmC, une protéine multidomaine avec un domaine FERM et des répétitions riches en leucine (LRR), a pu être validée. Les domaines FERM sont retrouvés dans des protéines associées au cytosquelette et qui lient différents partenaires cytosoliques à l'interface entre la membrane plasmique et le cytosquelette. AdcA est enrichie sur les macropinosomes juste refermés, c'est-à-dire sur des vésicules encore proches de la membrane plasmique et entourées d'actine. Un rôle pour une protéine à domaine FERM est tout à fait logique sur de telles vésicules. Le challenge actuel est de comprendre comment fonctionne FrmC et avec qui. Une stratégie basée sur des constructions d'inactivation ou de surexpression de constructions étiquetées est susceptible d'apporter des réponses à ces questions.

L'analyse des partenaires d'AdcA par double hybride a généré une liste d'une dizaine de protéines. Je n'ai pas eu le temps de valider ces interactions, ni de les caractériser plus en avant. Plusieurs partenaires candidats m'intéressent plus particulièrement.

Le premier est la polyphosphoinositide phosphatase Sac3/Fig4. Il s'agit d'une protéine qui cible le PtdIns(3,5)P₂ et qui est spécifique de la position 5. Le résultat de l'hydrolyse de ce

lipide que l'on retrouve sur la vacuole de levure est le PI(3)P. Le PI(3)P de *Dictyostelium* qui recrute le domaine d'AdcA pourrait donc avoir une double origine : la phosphorylation du phosphatidylinositol par une PI 3-kinase de classe III homologue de Vps34 et la déphosphorylation du PtdIns(3,5)P₂ par Sac3/Fig4.

Le deuxième favori est une protéine à domaine TBC1 avec une activité GAP prédite. L'homologue de mammifère, TBC1D5, est une Rab-GAP qui intervient dans la formation du rétromère et qui régule négativement le recrutement de Vps35/Vps26/Vps29. Il est tout à fait possible qu'AdcA et Vps26, tous deux membres de la superfamille des arrestines et protéines d'échafaudage, partagent des mécanismes globaux de recrutement. Il est peu probable que TBC1 soit la GAP d'ArfA, mais son ligand n'est pas établi de façon biochimique. Sans doute une protéine Rab (Rab7) intervient-elle avec TBC1.

Un dernier partenaire qui m'interpelle est l'homologue amibien d'UPS 27. Cette protéase spécifique des ubiquitines (desubiquitinase) participe à l'édition de l'ubiquitine et peut empêcher la dégradation d'une protéine membranaire en coupant son étiquette ubiquitine, permettant ainsi son maintien sur les membranes et vésicules qui participent au trafic. Une telle activité favorise le recyclage de protéines membranaires qui auraient été ubiquitinées pour leur endocytose.

Enfin, AdcA est une des 6 protéines à domaine arrestine de *Dictyostelium*. Une prolongation évidente de mon travail est la caractérisation de l'ensemble des membres de la famille et la compréhension de leur fonction. L'intérêt d'une étude étendue à toute la famille Adc réside dans le fait que les Adc de *Dictyostelium* diffèrent par leurs domaines additionnels, domaine FYVE pour AdcA et AdcD et domaine C2 pour AdcB et AdcC. En particulier, si le domaine C2 d'AdcB et -C les cible à la membrane plasmique, il est plausible que ces isoformes fonctionnent de façon plus comparable aux arrestines conventionnelles.

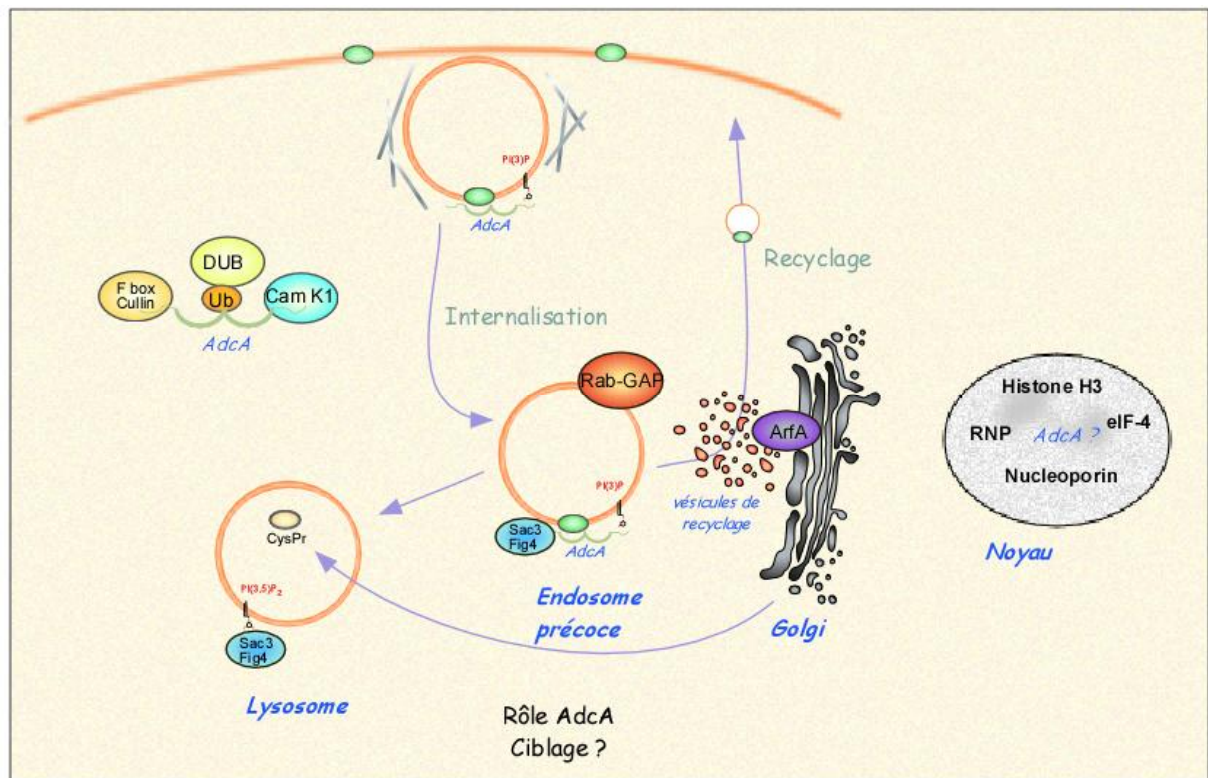


Figure 58 : Proposition d'un mécanisme modèle pour le fonctionnement de la protéine AdcA incluant certains des partenaires potentiels identifiés en double hybride et en pull down, mais non encore validés.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn, S., Shenoy, S.K., Wei, H., and Lefkowitz, R.J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279, 35518-35525.
- Alvarez, C.E. (2008). On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol Biol* 8, 222.
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267, 17882-17890.
- Aubry, L., Guetta, D., and Klein, G. (2009). The arrestin fold: variations on a theme. *Curr Genomics* 10, 133-142.
- Aubry, L., Klein, G., Martiel, J.L., and Satre, M. (1993). Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Study by fluorescence spectroscopy. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 861-866.
- Aubry, L., Klein, G., Martiel, J.L., and Satre, M. (1997). Fluid-phase endocytosis in the amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*: Mathematical modelling of kinetics and pH evolution. *J. Theor. Biol.* 184, 89-98.
- Aubry, L., Mattei, S., Blot, B., Sadoul, R., Satre, M., and Klein, G. (2002). Biochemical characterization of two analogues of the apoptosis-linked gene 2 protein in *Dictyostelium discoideum* and interaction with a physiological partner in mammals, murine alix. *J. Biol. Chem.* 277, 21947-21954.
- Barak, L.S., Gilchrist, J., Becker, J.M., and Kim, K.M. (2006). Relationship between the G protein signaling and homologous desensitization of G protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 695-700.
- Barki-Harrington, L., and Rockman, H.A. (2008). Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology* 23, 17-22.
- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261-273.
- Bennett, N., Letourneur, F., Ragno, M., and Louwagie, M. (2008). Sorting of the v-SNARE VAMP7 in *Dictyostelium discoideum*: a role for more than one Adaptor Protein (AP) complex. *Exp. Cell Res.* 314, 2822-2833.
- Bennett, T.A., Maestas, D.C., and Prossnitz, E.R. (2000). Arrestin binding to the G protein-coupled N-formyl peptide receptor is regulated by the conserved "DRY" sequence. *J. Biol. Chem.* 275, 24590-24594.
- Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8879-8882.
- Beug, H., Katz, F.E., and Gerisch, G. (1973). Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* 56, 647-658.
- Bhandari, D., Trejo, J., Benovic, J.L., and Marchese, A. (2007). Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 282, 36971-36979.
- Billiet, L., Furman, C., Larigauderie, G., Copin, C., Page, S., Fruchart, J.C., Brand, K., and Rouis, M. (2008). Enhanced VDUP-1 gene expression by PPARgamma agonist induces apoptosis in human macrophage. *J. Cell Physiol.* 214, 183-191.
- Blanc, C., Charette, S.J., Mattei, S., Aubry, L., Smith, E.W., Cosson, P., and Letourneur, F. (2009). *Dictyostelium* Tom1 participates to an ancestral ESCRT-0 complex. *Traffic* 10, 161-171.
- Blatner, N.R., Stahelin, R.V., Diraviyam, K., Hawkins, P.T., Hong, W., Murray, D., and Cho, W. (2004). The molecular basis of the differential subcellular localization of FYVE domains. *J. Biol. Chem.* 279, 53818-53827.

- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.
- Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Peppel, K., Caron, M.G., and Lin, F.T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 286, 2495-2498.
- Bonner, J.T. (1967). The cellular slime molds. Second edition. Princeton Univ. Press: Princeton, NJ.
- Brunecky, R., Lee, S., Rzepecki, P.W., Overduin, M., Prestwich, G.D., Kutateladze, A.G., and Kutateladze, T.G. (2005). Investigation of the binding geometry of a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 44, 16064-16071.

- C**harette, S.J., Mercanti, V., Letourneur, F., Bennett, N., and Cosson, P. (2006). A role for adaptor protein-3 complex in the organization of the endocytic pathway in *Dictyostelium*. *Traffic* 7, 1528-1538.
- Chen, K.S., and DeLuca, H.F. (1994). Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 26-32.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J., and Blobel, G.C. (2003a). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301, 1394-1397.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nüsse, R., and Lefkowitz, R.J. (2003b). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301, 1391-1394.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 42509-42513.
- Clarke, M., Kohler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J., and Gerisch, G. (2002). Dynamics of the vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of *Dictyostelium* cells. *J. Cell Sci.* 115, 2893-2905.
- Cosson, P., and Soldati, T. (2008). Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 271-276.
- Craft, C.M., Whitmore, D.H., and Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J. Biol. Chem.* 269, 4613-4619.

- D**'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 347-358.
- De Lozanne, A., and Spudich, J.A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236, 1086-1091.
- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D., and Bunnett, N.W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J. Cell Biol.* 148, 1267-1281.
- Donaldson, J.G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 41573-41576.
- Draheim, K.M., Chen, H.B., Tao, Q., Moore, N., Roche, M. and Lyle, S. (2010). ARRDC3 suppresses breast cancer progression by negatively regulating integrin β 4. *Oncogene* 29, 5032-5047.

- E**gelhoff, T.T., and Spudich, J.A. (1991). Molecular genetics of cell migration: *Dictyostelium* as a model system. *Trends Genet.* 7, 161-166.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C.,

Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., and Kuspa, A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 43-57.

Ferguson, S.S., Downey, W.E., 3rd, Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L., and Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271, 363-366.

Fong, A.M., Premont, R.T., Richardson, R.M., Yu, Y.R., Lefkowitz, R.J., and Patel, D.D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7478-7483.

Gage, R.M., Kim, K.A., Cao, T.T., and von Zastrow, M. (2001). A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 44712-44720.

Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., and Keen, J.H. (1999). Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 18, 871-881.

Gaullier, J.M., Ronning, E., Gillooly, D.J., and Stenmark, H. (2000). Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *J. Biol. Chem.* 275, 24595-24600.

Ge, L., Ly, Y., Hollenberg, M., and DeFea, K. (2003). A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 278, 34418-34426.

Gibson, S.K., Parkes, J.H., and Liebman, P.A. (2000). Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin. *Biochemistry* 39, 5738-5749.

Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 19, 4577-4588.

Girmita, L., Shenoy, S.K., Sehat, B., Vasilcanu, R., Girmita, A., Lefkowitz, R.J., and Larsson, O. (2005). {beta}-Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 24412-24419.

Golstein, P., Aubry, L., and Levraud, J.P. (2003). Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 798-807.

Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., and Benovic, J.L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.

Gräf, R., Daunderer, C., and Schliwa, M. (1999). Cell cycle-dependent localization of monoclonal antibodies raised against isolated *Dictyostelium* centrosomes. *Biol. Cell* 91, 471-477.

Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., and Buldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918-921.

Gurevich, V.V., and Benovic, J.L. (1995). Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J. Biol. Chem.* 270, 6010-6016.

- Gurevich, V.V., and Benovic, J.L. (1997). Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state. *Mol. Pharmacol.* 51, 161-169.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 105-111.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 110, 465-502.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75, 791-803.

- H**adwiger, J.A., and Firtel, R.A. (1992). Analysis of G alpha 4, a G-protein subunit required for multicellular development in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* 6, 38-49.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B., and Schubert, C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* 9, 869-880.
- Hanson, S.M., Van Eps, N., Francis, D.J., Altenbach, C., Vishnivetskiy, S.A., Arshavsky, V.Y., Klug, C.S., Hubbell, W.L., and Gurevich, V.V. (2007). Structure and function of the visual arrestin oligomer. *EMBO J.* 26, 1726-1736.
- Hanson, S.M., Vishnivetskiy, S.A., Hubbell, W.L., and Gurevich, V.V. (2008). Opposing effects of inositol hexakisphosphate on rod arrestin and arrestin2 self-association. *Biochemistry* 47, 1070-1075.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor.
- Hayakawa, A., Hayes, S.J., Lawe, D.C., Sudharshan, E., Tuft, R., Fogarty, K., Lambright, D., and Corvera, S. (2004). Structural basis for endosomal targeting by FYVE domains. *J. Biol. Chem.* 279, 5958-5966.
- Herrador, A., Herranz, S., Lara, D., and Vincent, O. (2010). Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol. Cell Biol.* 30, 897-907.
- Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., and Vincent, O. (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12141-12146.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., and Sigler, P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97, 257-269.
- Hu, Y.H., Wamatz, H.J., Vanhecke, D., Wagner, F., Fiebitz, A., Thamm, S., Kahlem, P., Lehrach, H., Yaspo, M.L., and Janitz, M. (2006). Cell array-based intracellular localization screening reveals novel functional features of human chromosome 21 proteins. *BMC Genomics* 7, 155.

- I** mamoto, Y., Tamura, C., Kamikubo, H., and Kataoka, M. (2003). Concentration-dependent tetramerization of bovine visual arrestin. *Biophys. J.* 85, 1186-1195.
- Itoh, F., Divecha, N., Brocks, L., Oomen, L., Janssen, H., Calafat, J., Itoh, S., and Dijke Pt, P. (2002). The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells* 7, 321-331.

- J** avadpour, M.M., Eilers, M., Groesbeek, M., and Smith, S.O. (1999). Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys. J.* 77, 1609-1618.
- Johnson, E.C., Tift, F.W., McCauley, A., Liu, L., and Roman, G. (2008). Functional characterization of kurtz, a *Drosophila* non-visual arrestin, reveals conservation of GPCR desensitization mechanisms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 1016-1022.

- Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., and Devi, L.A. (2001). Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 343-348.
- Journet, A., Chapel, A., Jehan, S., Adessi, C., Freeze, H., Klein, G., and Garin, J. (1999). Characterization of *Dictyostelium discoideum* cathepsin D - Molecular cloning, gene disruption, endo-lysosomal localization and sugar modifications. *J. Cell Sci.* 112, 3833-3843.
- K**ang, J., Shi, Y., Xiang, B., Qu, B., Su, W., Zhu, M., Zhang, M., Bao, G., Wang, F., Zhang, X., Yang, R., Fan, F., Chen, X., Pei, G., and Ma, L. (2005). A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123, 833-847.
- Kara, E., Crepieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., and Reiter, E. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. *Mol. Endocrinol.* 20, 3014-3026.
- Kessin, R.H. (1988). Genetics of early *Dictyostelium discoideum* development. *Microbiol. Rev.* 52, 29-49.
- Kim, Y.M., Barak, L.S., Caron, M.G., and Benovic, J.L. (2002). Regulation of arrestin-3 phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 277, 16837-16846.
- Klein, G., and Satre, M. (1986). Kinetics of fluid-phase pinocytosis in *Dictyostelium discoideum* amoebae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 1146-1152.
- Kovacs, J.J., Hara, M.R., Davenport, C.L., Kim, J., and Lefkowitz, R.J. (2009). Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev. Cell* 17, 443-458.
- Kovoor, A., Celver, J., Abdryashitov, R.I., Chavkin, C., and Gurevich, V.V. (1999). Targeted construction of phosphorylation-independent beta-arrestin mutants with constitutive activity in cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6831-6834.
- Kuhn, H., Hall, S.W., and Wilden, U. (1984). Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. *FEBS Lett.* 176, 473-478.
- Kutateladze, T., and Overduin, M. (2001). Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science* 291, 1793-1796.
- Kutateladze, T.G. (2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 868-877.
- L**aporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 275, 23120-23126.
- Lavoie, C., Mercier, J.F., Salahpour, A., Umaphathy, D., Breit, A., Villeneuve, L.R., Zhu, W.Z., Xiao, R.P., Lakatta, E.G., Bouvier, M., and Hebert, T.E. (2002). Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J. Biol. Chem.* 277, 35402-35410.
- Lee S.A., Eyeson R., Cheever M.L., Geng J., Verkhusha V.V., Burd C., Overduin M., and Kutateladze T.G. (2005). Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13052-13057.
- Lefkir, Y., Malbouyres, M., Gotthardt, D., Ozinsky, A., Cornillon, S., Bruckert, F., Aderem, A.A., Soldati, T., Cosson, P., and Letourneur, F. (2004). Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 861-869.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.
- Lin, C.H., MacGurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., and Emr, S.D. (2008). Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135, 714-725.

- Lin, F.T., Daaka, Y., and Lefkowitz, R.J. (1998). beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 31640-31643.
- Lin, F.T., Krueger, K.M., Kendall, H.E., Daaka, Y., Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A., and Lefkowitz, R.J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* 272, 31051-31057.
- Lin, F.T., Miller, W.E., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 15971-15974.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.
- Loomis, W.F. (1975). *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. Ac. Press: New York.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283, 655-661.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2449-2454.

- M**a, J., and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51, 113-119.
- Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., and Corsini, G.U. (2005). The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J.* 272, 2939-2946.
- Malik, R., and Marchese, A. (2010). Arrestin-2 Interacts with the ESCRT Machinery to Modulate Endosomal Sorting of CXCR4. *Mol. Biol. Cell* 2010 May 26. [Epub ahead of print]
- Mattei, S., Klein, G., Satre, M., and Aubry, L. (2006). Trafficking and developmental signaling: Alix at the crossroads. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 925-936.
- McDowell, J.H., Robinson, P.R., Miller, R.L., Brannock, M.T., Arendt, A., Smith, W.C., and Hargrave, P.A. (2001). Activation of arrestin: requirement of phosphorylation as the negative charge on residues in synthetic peptides from the carboxyl-terminal region of rhodopsin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1439-1443.
- McLaughlin, N.J., Banerjee, A., Kelher, M.R., Gamboni-Robertson, F., Hamiel, C., Sheppard, F.R., Moore, E.E., and Silliman, C.C. (2006). Platelet-activating factor-induced clathrin-mediated endocytosis requires beta-arrestin-1 recruitment and activation of the p38 MAPK signalosome at the plasma membrane for actin bundle formation. *J. Immunol.* 176, 7039-7050.
- McRobbie, S.J., and Newell, P.C. (1984). Chemoattractant-mediated changes in cytoskeletal actin of cellular slime moulds. *J. Cell Sci.* 68, 139-151.
- Milano, S.K., Kim, Y.M., Stefano, F.P., Benovic, J.L., and Brenner, C. (2006). Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* 281, 9812-9823.
- Milano, S.K., Pace, H.C., Kim, Y.M., Brenner, C., and Benovic, J.L. (2002). Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* 41, 3321-3328.
- Mittal, R., and McMahon, H.T. (2009). Arrestins as adaptors for ubiquitination in endocytosis and sorting. *EMBO Rep.* 10, 41-43.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat. Cell Biol.* 7, 1191-1201.
- Mundell, S.J., Matharu, A.L., Kelly, E., and Benovic, J.L. (2000). Arrestin isoforms dictate differential kinetics of A2B adenosine receptor trafficking. *Biochemistry* 39, 12828-12836.
- Murakami, A., Yajima, T., Sakuma, H., McLaren, M.J., and Inana, G. (1993). X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS Lett.* 334, 203-209.

- N**air, K.S., Hanson, S.M., Mendez, A., Gurevich, E.V., Kennedy, M.J., Shestopalov, V.I., Vishnivetskiy, S.A., Chen, J., Hurley, J.B., Gurevich, V.V., and Slepak, V.Z. (2005). Light-dependent redistribution of arrestin in vertebrate rods is an energy-independent process governed by protein-protein interactions. *Neuron* 46, 555-567.
- Neuhaus, E.M., Mashukova, A., Barbour, J., Wolters, D., and Hatt, H. (2006). Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa. *J. Cell Sci.* 119, 3047-3056.
- Nguyen, H.N., Raisley, B., and Hadwiger, J.A. (2010). MAP kinases have different functions in *Dictyostelium* G protein-mediated signaling. *Cell Signal.* 22, 836-847.
- Nikko, E., Sullivan, J.A., and Pelham, H.R. (2008). Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* 9, 1216-1221.
- Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., and Yodoi, J. (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.* 274, 21645-21650.
- Nolta, K.V., Rodriguez-Paris, J.M., and Steck, T.L. (1994). Analysis of successive endocytic compartments isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation. *Biochim. Biophys. Acta* 1224, 237-246.
- O**akley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 19452-19460.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 17201-17210.
- P**aasche, J.D., Attramadal, T., Kristiansen, K., Oksvold, M.P., Johansen, H.K., Huitfeldt, H.S., Dahl, S.G., and Attramadal, H. (2005). Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* 67, 1581-1590.
- Palmitessa, A., Hess, H.A., Bany, I.A., Kim, Y.M., Koelle, M.R., and Benovic, J.L. (2005). *Caenorhabditis elegans* arrestin regulates neural G protein signaling and olfactory adaptation and recovery. *J. Biol. Chem.* 280, 24649-24662.
- Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D., and De Blasi, A. (1993). Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 268, 9753-9761.
- Pawson, T., and Scott, J.D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Pellegrini-Calace, M., and Tramontano, A. (2006). Identification of a novel putative mitogen-activated kinase cascade on human chromosome 21 by computational approaches. *Bioinformatics* 22, 775-778.
- Povsic, T.J., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 51334-51339.
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J.L., Pitcher, J.A., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R.J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14082-14087.

- R**aper, K.B. (1984). The Dictyostelids. Princeton Univ. Press: Princeton, NJ.
- Ravanel, K., de Chassey, B., Cornillon, S., Benghezal, M., Zulianello, L., Gebbie, L., Letourneur, F., and Cosson, P. (2001). Membrane sorting in the endocytic and phagocytic pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 754-764.
- Reinders, Y., Schulz, I., Gräf, R., and Sickmann, A. (2006). Identification of novel centrosomal proteins in *Dictyostelium discoideum* by comparative proteomic approaches. *J. Proteome Res.* 5, 589-598.
- Revankar, C.M., Vines, C.M., Cimino, D.F., and Prossnitz, E.R. (2004). Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 24578-24584.
- S**asakawa, N., Sharif, M., and Hanley, M.R. (1995). Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem. Pharmacol.* 50, 137-146.
- Schmid, C.L., and Bohn, L.M. (2009). Physiological and pharmacological implications of beta-arrestin regulation. *Pharmacol. Ther.* 121, 285-293.
- Schulze, P.C., De Keulenaer, G.W., Yoshioka, J., Kassik, K.A., and Lee, R.T. (2002). Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. *Circ. Res.* 91, 689-695.
- Scott, M.G., Benmerah, A., Muntaner, O., and Marullo, S. (2002). Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J. Biol. Chem.* 277, 3552-3559.
- Shenoy, S.K., Drake, M.T., Nelson, C.D., Houtz, D.A., Xiao, K., Madabushi, S., Reiter, E., Premont, R.T., Lichtarge, O., and Lefkowitz, R.J. (2006). beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 1261-1273.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003). Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278, 14498-14506.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005a). Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch. *Nat. Cell Biol.* 7, 1159-1161.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2005b). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J. Biol. Chem.* 280, 15315-15324.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-1313.
- Shenoy, S.K., Modi, A.S., Shukla, A.K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K.D., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 6650-6655.
- Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2006). The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 540-548.
- Shinoda, J., and Kikuchi, Y. (2007). Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 258-263.
- Simaan, M., Bedard-Goulet, S., Fessart, D., Gratton, J.P., and Laporte, S.A. (2005). Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal.* 17, 1074-1083.
- Skegro, D., Pulvermuller, A., Krafft, B., Granzin, J., Hofmann, K.P., Buldt, G., and Schlesinger, R. (2007). N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* 83, 385-392.

- Song, X., Raman, D., Gurevich, E.V., Vishnivetskiy, S.A., and Gurevich, V.V. (2006). Visual and both non-visual arrestins in their "inactive" conformation bind JNK3 and Mdm2 and relocalize them from the nucleus to the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 281, 21491-21499.
- Steinert, M., and Heuner, K. (2005). *Dictyostelium* as host model for pathogenesis. *Cell Microbiol.* 7, 307-314.
- Storez, H., Scott, M.G., Issafras, H., Burtey, A., Benmerah, A., Muntaner, O., Piolot, T., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Bouvier, M., Labbe-Jullie, C., and Marullo, S. (2005). Homo- and hetero-oligomerization of beta-arrestins in living cells. *J. Biol. Chem.* 280, 40210-40215.
- Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 277, 49212-49219.
- Swanson, A.R., Spiegel, F.W., and Cavender, J.C. (2002). Taxonomy, slime molds, and the questions we ask. *Mycologia* 94, 968-979.
- Szabo, E.Z., Numata, M., Lukashova, V., Iannuzzi, P., and Orlowski, J. (2005). beta-Arrestins bind and decrease cell-surface abundance of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2790-2795.
- T**an, C.M., Brady, A.E., Nickols, H.H., Wang, Q., and Limbird, L.E. (2004). Membrane trafficking of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 559-609.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J.* 23, 3950-3961.
- Thilo, L., and Vogel, G. (1980). Kinetics of membrane internalization and recycling during pinocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1015-1019.
- Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* 277, 9429-9436.
- U**rushihara, H. (2009). The cellular slime mold: eukaryotic model microorganism. *Exp. Anim.* 58, 97-104.
- V**iolin, J.D., and Lefkowitz, R.J. (2007). Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 416-422.
- Vishnivetskiy, S.A., Hirsch, J.A., Velez, M.G., Gurevich, Y.V., and Gurevich, V.V. (2002). Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge. *J. Biol. Chem.* 277, 43961-43967.
- Vishnivetskiy, S.A., Schubert, C., Climaco, G.C., Gurevich, Y.V., Velez, M.G., and Gurevich, V.V. (2000). An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J. Biol. Chem.* 275, 41049-41057.
- W**acker, W.B., Donoso, L.A., Kalsow, C.M., Yankeelov, J.A., Jr., and Organisciak, D.T. (1977). Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.* 119, 1949-1958.
- Walker, J.K., Fong, A.M., Lawson, B.L., Savov, J.D., Patel, D.D., Schwartz, D.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Beta-arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *J. Clin. Invest.* 112, 566-574.
- Wang, Y., Tang, Y., Teng, L., Wu, Y., Zhao, X., and Pei, G. (2006). Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 139-147.

- Watts, D.J., and Ashworth, J.M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- Weiner, O.H., Murphy, J., Griffiths, G., Schleicher, M., and Noegel, A.A. (1993). The actin-binding protein Comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **123**, 23-34.
- Wienke, D., Drengk, A., Schmauch, C., Jenne, N., and Maniak, M. (2006). Vacuolin, a flotillin/reggie-related protein from *Dictyostelium* oligomerizes for endosome association. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 991-1000.
- Wilbanks, A.M., Fralish, G.B., Kirby, M.L., Barak, L.S., Li, Y.X., and Caron, M.G. (2004). Beta-arrestin 2 regulates zebrafish development through the hedgehog signaling pathway. *Science* **306**, 2264-2267.
- Williams, J.G., Duffy, K.T., Lane, D.P., McRobbie, S.J., Harwood, A.J., Traynor, D., Kay, R.R., and Jermyn, K.A. (1989). Origins of the prestalk-prespore pattern in *Dictyostelium* development. *Cell* **59**, 1157-1163.
- Williams, K.L., Kessin, R.H., and Newell, P.C. (1974). Parasexual genetics in *Dictyostelium discoideum*: Mitotic analysis of acriflavin resistance and growth in axenic medium. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 59-69.
- Williams, R.O., Young, J.R., and Majiwa, P.A. (1979). Genomic rearrangements correlated with antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Nature* **282**, 847-849.
- Wisler, J.W., DeWire, S.M., Whalen, E.J., Violin, J.D., Drake, M.T., Ahn, S., Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2007). A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16657-16662.
- Wistow, G.J., Katial, A., Craft, C., and Shinohara, T. (1986). Sequence analysis of bovine retinal S-antigen. Relationships with alpha-transducin and G-proteins. *FEBS Lett.* **196**, 23-28.
- Witherow, D.S., Garrison, T.R., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2004). beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8603-8607.
- X**iao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R., 3rd, and Lefkowitz, R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12011-12016.
- Xu, T.R., Baillie, G.S., Bhari, N., Houslay, T.M., Pitt, A.M., Adams, D.R., Kolch, W., Houslay, M.D., and Milligan, G. (2008). Mutations of beta-arrestin 2 that limit self-association also interfere with interactions with the beta2-adrenoceptor and the ERK1/2 MAPKs: implications for beta2-adrenoceptor signalling via the ERK1/2 MAPKs. *Biochem. J.* **413**, 51-60.
- Y**amanaka, H., Maehira, F., Oshiro, M., Asato, T., Yanagawa, Y., Takei, H., and Nakashima, Y. (2000). A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 796-800.
- Z**hang, H., Gomez-Garcia, M.R., Shi, X., Rao, N.N., and Kornberg, A. (2007). Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16486-16491.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des anticorps utilisés dans ce travail

Western blots			
Anticorps primaire	Source	Type	Dilution
anti-GFP	Roche	mix de 2 mAc	1/1000
anti-GST	don C. Delphin	pAc lapin	1/10000
anti-LexA sc7544	Santa Cruz	mAc souris	1/100
anti-myc 9E10	Roche	mAc souris	1/1000
anti-Arf EP442Y	Epitomics	mAc lapin	1/500
anti-AdcA AcC-AdcA	ce travail	pAc cobaye	1/1000
HRP anti-His	Sigma	mAc souris	1/3000
anti-AdcA AcL-AdcA	ce travail	pAc lapin	1/1000
anti-RFP 5F8	Chromotek	mAc rat	1/1000

Immunofluorescence			
Anticorps primaire	Source	Type	Dilution
anti-p25 (H72)	don P. Cosson	mAc souris	1/800
anti-p80 (H161)	don P. Cosson	mAc souris	1/10000
anti-cathepsine	don A. Journet	mAc souris	1/2500
anti-AdcA AcC-AdcA	ce travail	pAc cobaye	1/1000
anti-actine	don A. Journet	pAc lapin	1/40
anti-myc	Roche	mAc souris	1/1000

Immunoprécipitation			
Anticorps primaire	Source	Type	Dilution
anti-GFP	Roche	mAc souris	2 mg/IP (2.10^7 cell.)
anti-myc 9E10	Roche	mAc souris	2,5 mg/IP (2.10^7 cell.)
anti-AdcA AcC-AdcA	ce travail	pAc cobaye	1/500

AdcA

1/1
 ATG AAT TAC CAA GTA ACT GTT TCA GGT GAT CCA GAA CTT GCA CAA GAA AGT GTT GAT TTC GTA TCA AGT GGA TTT GGT AAT ATG TCA ATG
 M N Y Q V T V S G D P E L A Q E S V D F V S S G F G N M S M

31/11
 CCA GAA CTT GCA CAA GAA AGT GTT GAT TTC

61/21
 GTA TCA AGT GGA TTT GGT AAT ATG TCA ATG

91/31
 AAT GTA AAT ACC ACC TCA AGT CAT CAT CAT CAT CAT AGC AAT AGT GGT AAT GCT GAA GTT TCA TTC AAT GGT GGA TTT GGT ATG CCA AAT
 N V N T T S S H H H H H S N S G N A E V S F N G G F G M P N

121/41
 CAT CAT AGC AAT AGT GGT AAT GCT GAA GTT

151/51
 TCA TTC AAT GGT GGA TTT GGT ATG CCA AAT

181/61
 ATG ACT ATG GAA GTC AAA GAA ACT CAT AGT GGT CAC CAT CAC CAC CAT AGT AAT GGT GGT AAT GCA GAA ATC TCA ATT AAC AGT GGA TTT
 M T M E V K E T H S G H H H H H S N G G N A E I S I N S G F

211/71
 GGT CAC CAT CAC CAC CAT AGT AAT GGT GGT

241/81
 AAT GCA GAA ATC TCA ATT AAC AGT GGA TTT

271/91
 GGT ATG CCA TCT ATG ACA ATG TCA GTC ACA GAT AGT AAT AGT GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT AAA GAA AGT GCA TCA GTT AAT TTA TCA
 G M P S M T M S V T D S N S G H H H H H H H K E S A S V N L S

301/101
 GAT AGT AAT AGT GGT CAT CAT CAC CAT CAC

331/111
 CAT AAA GAA AGT GCA TCA GTT AAT TTA TCA

361/121
 TTA GGT GGT ATT GTT GGA GCA GTT GTT GGT GCA GTT ACT GGT GGT GTT ATG ATT GAT GGT CGT AAT CGT ATT TGG GTG CAA TTG AAT CAA
 L G G I V G A V V G A V T G G V M I D G R N R I W V Q L N Q

391/131
 GCA GTT ACT GGT GGT GTT ATG ATT GAT GGT

421/141
 CGT AAT CGT ATT TGG GTG CAA TTG AAT CAA

451/151 **NdeI** **EcoRV**
 TCA TCA TAT GTC GGT GGT GAT ATC ATT AGT GGT ACA ATT GAA ATG GAC TGT ATA GTG CCA TTC TTT GCC AAA GGT GTC ATT GTC AAA GTT
 S S Y V G G D I I S G T I E M D C I V P F F A K G V I V K V

481/161
 GGT ACA ATT GAA ATG GAC TGT ATA GTG CCA

511/171
 TTC TTT GCC AAA GGT GTC ATT GTC AAA GTT

541/181
 AAA GGT TTT GAA AGA TTA TGG CTT CAA GAA CTT CGT ACT GAA ACT GAA GGT GAG GGC TCA AAC AAA CGT ACA GTT TAT AAA ACC ATT GAT
 K G F E R L W L Q E L R T E T E G E G S N K R T V Y K T I D

571/191
 CTT CGT ACT GAA ACT GAA GGT GAG GGC TCA

601/201
 AAC AAA CGT ACA GTT TAT AAA ACC ATT GAT

Intron 87bp
 631/211
 CAT AAA GAA AAT AAA GAA TTT TTC AAA TCA ACA ATT GTT GTT TAT CCA CAA GCA GGT ACA GTT AAT TGT GGA CAT TAT AGT TTC CCA TTT
 H K E N K E F F K S T I V V Y P Q A G T V N C G H Y S F P F

661/221
 ACA ATT GTT GTT TAT CCA CAA GCA GGT ACA

691/231
 GTT AAT TGT GGA CAT TAT AGT TTC CCA TTT

721/241
 TCA TAT CAA TTA CCA TCA GAT TTA CCA GGC ACA TTT TGT CAT GAT GGT AAG GAT GCA ATG GGA GCA TAT TCA GCA AAG ATT TTA TAT AAA
 S Y Q L P S D L P G T F C H D G K D A M G A Y S A K I L Y K

751/251
 781/261

811/271
 TGT AAA GCA ACC GTT GAT GTT GCA CAT AAA CAC GAT TTG AAA TCA ACT ACT AAA TTA ATT ATC AAT GAG AAA TGT GGT GAA TTG GTT CAA
 C K A T V D V A H K H D L K S T T K L I I N E K C G E L V Q

841/281
 871/291

901/301
 CCA AGT TTT GCA GAG AAT AAG AAA TCA TTC ATG TTG ACC AAA GGT AAA TTG CAT GTA AAG ACA TGG TTG AAT AAG AAT GCC TAT TTC CCA
 P S F A E N K K S F M L T K G K L H V K T W L N K N A Y F P

931/311
 961/321

991/331
 GGC GAG ACA TTG GTT GCC AAA ATG AAG GCA AAC AAT ACC TCA ATT AAA CCA ACT AGA AAG **ATC** TCA TTG GTG GTA CAC CAT ACA ATG CAA
 G E T L V A K M K A N N T S I K P T R K I S L V V H H T M Q

1021/341
BglIII 1051/351

1081/361
 TTG AAG ACA CGT CTT TAT CAT CGT TGT ATC ACC AAT GCA ATT TAT AAA CAG CAA TAC GAC GGC TTC CAA CCA TGC TTC TAT GGC AAG CGT
 L K T R L Y H R C I T N A I Y K Q Q Y D G F Q P C F Y G K R

1111/371
 1141/381

1171/391
 TAT CTC CCA TTC TCA ATA CCA GTG GAT TTG AAA CCA TCA TCT TCC TTG GGT AAA CAT ATC ACA AGT AGC TAT CTA TTG GAG TTG GAG TGC
 Y L P F S I P V D L K P S S S L G K H I T S S Y L L E L E C

1201/401
 1231/411

1261/421 **EcoRV** **ClaI**
GAT ATC CCA ATG GCA **ATC GAT** TTA TCT GTA ACC TTG CCA TTG ACC TTA TTC GCC CCA CAA TTC CTC TAC AGC ACT GTA CCA TCT CAA CCA
 D I P M A I D L S V T L P L T L F A P Q F L Y S T V P S Q P

1291/431
 1321/441

1351/451
 CCA GGT ACT CCA TTA CCA CCT GAT GTC TCA TAT CGT CAT **CCA TGG** GAA GGT GAT GAA CAT GCT ACC GCT TGT CGT AAA TGT AAT AAA GGA
 P G T P L P P D V S Y R H P W E G D E H A T A C R K C N K G

1381/461
NcoI 1411/471

1441/481
 TTT AGT TTG TTT GCT CGT AAA CAT CAT TGT CGT CAT TGT ATG AAG ATT TTC TGT GAT AAA TGT ACC TCA ACC AAA ACT ACA ATC ACT AAA
 F S L F A R K H H C R H C M K I F C D K C T S T K T T I T K

1471/491
 1501/501

1531/511

TTA GCT TAT CCA AAA CCA GTT CGT GTT TGT
L A Y P K P V R V C

1561/521

GAA GAA TGT TAT CCA ATC GCA ACT CAA GGT
E E C Y P I A T Q G

1591/531

GGT AAC AAA TAT CAA TCA GCT AAA TTA ATG
G N K Y Q S A K L M

1621/541

GCT GCT CAA TAT CAA GCA AGT TTA AAT GCT
A A Q Y Q A S L N A Y Y A Q Y A S L Y P Q I Y P D Q Q Q Q Q

1651/551

TAT TAT GCT CAA TAT GCT TCT TTA TAT CCA
Y Y A Q Y A S L Y P Q I Y P D Q Q Q Q Q

1681/561

CAA ATT TAT CCA GAT CAA CAA CAA CAA CAA
Q I Y P D Q Q Q Q Q

1711/571

CAA CAA CCA TCT GCT CCA CCA CAA CAA TAT TAA
Q Q P S A P P Q Q Y *

1741/581

TAA
*

ArfA

```

1/1                               31/11                               61/21
|                               |                               |
ATG GGT CTC GCT TTT GGT AAA CTT TTC AGC CGT TTC TTT GGC AAA AAA GAT ATG AGA ATT TTA ATG GTC GGT TTA GAT GCT GCT GGT AAA
M   G   L   A   F   G   K   L   F   S   R   F   F   G   K   K   D   M   R   I   L   M   V   G   L   D   A   A   G   K

91/31                             121/41                             151/51
| mutation DN T31N              |                               |                               EcoRI
ACC ACC ATT TTA TAC AAA CTT AAA TTA GGT GAA ATT GTT ACT ACA ATT CCA ACC ATT GGT TTC AAT GTC GAA ACT GTC GAA TTC AAA AAC
T   T   I   L   Y   K   L   K   L   G   E   I   V   T   T   I   P   T   I   G   F   N   V   E   T   V   E   F   K   N

181/61                             211/71                             241/81
|                               | Mutation CA Q71L              |
ATT AAC TTC ACT GTA TGG GAT GTT GGT GGT CAA GAT AAA ATT CGT CCA TTA TGG AGA CAT TAT TTC CAA AAT ACT CAA GGT CTT ATC TTT
I   N   F   T   V   W   D   V   G   G   Q   D   K   I   R   P   L   W   R   H   Y   F   Q   N   T   Q   G   L   I   F

271/91                             301/101                             331/111
|                               | EcoRI | HindIII              |
GTT GTT GAT TCA AAC GAT AGA GAA AGA ATT CAA GAA GCT TGT GAT GAA CTC ACT AAA ATG CTC AAT GAA GAT GAA TTA CGT GAT GCT GTT
V   V   D   S   N   D   R   E   R   I   Q   E   A   C   D   D   E   L   T   K   M   L   N   E   D   E   L   R   D   A   V

361/121                             391/131                             421/141
|                               |                               |                               |
TTA TTA GTT TTC TGT AAC AAA CAA GAT CTT CCA AAT GCC ATG AGT GTC GCT GAA GTT ACC GAT AAA TTA AAT CTC CAC TCT CTC CGT TCA
L   L   V   F   C   N   K   Q   D   L   P   N   A   M   S   V   A   E   V   T   D   K   L   N   L   H   S   L   R   S

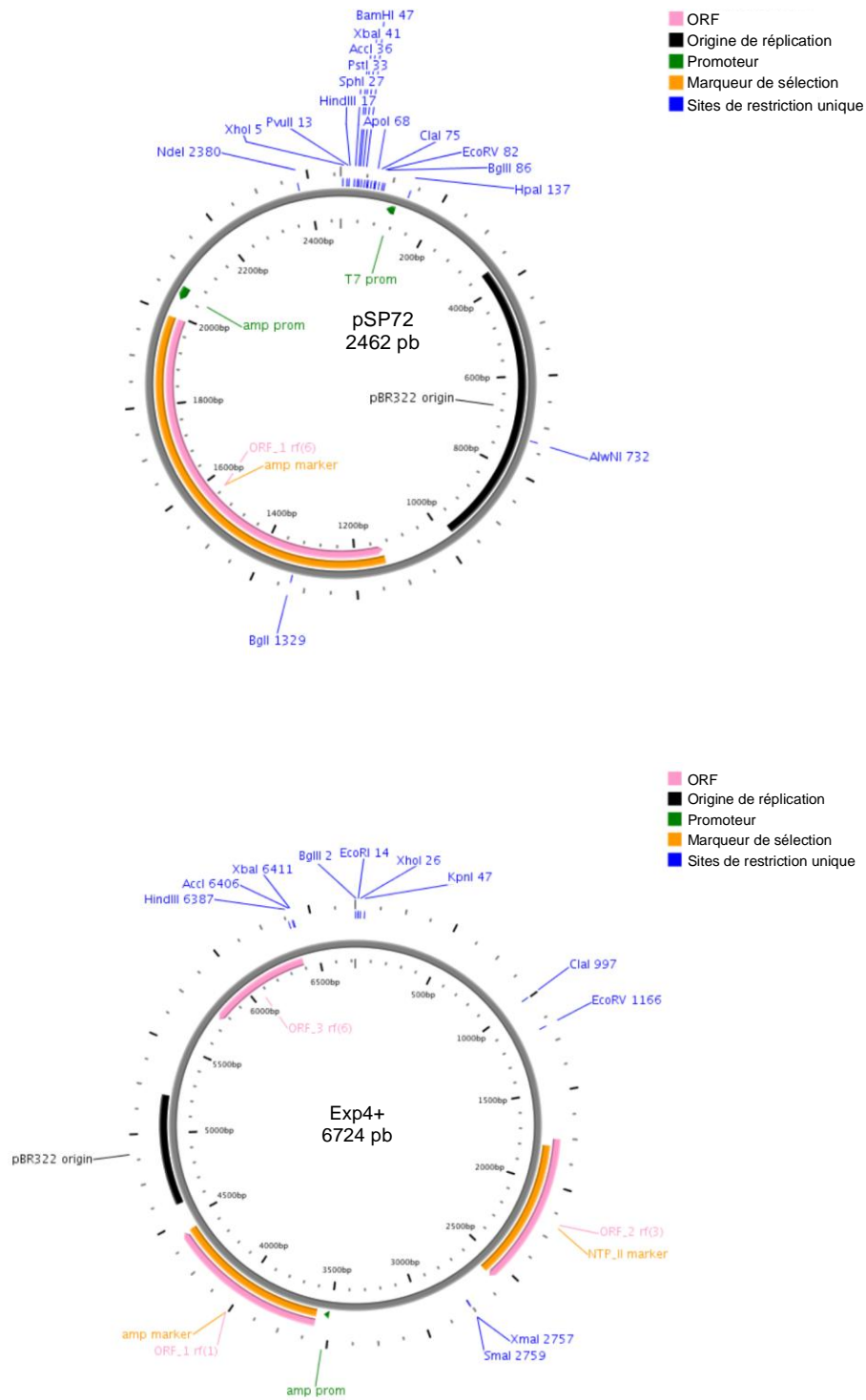
451/151                             481/161                             511/171
|                               |                               |
AGA AAA TGG TAC ATA CAG TCA ACT TGT GCC ACC AGT GGT GAT GGT TTA TAT GAA GGT TTA GAC TGG CTC TCA AAT ACC TTA ACA AGC TCC
R   K   W   Y   I   Q   S   T   C   A   T   S   G   D   G   L   Y   E   G   L   D   W   L   S   N   T   L   T   S   S

541/181
|
TCA AAA TAA
S   K   *

```

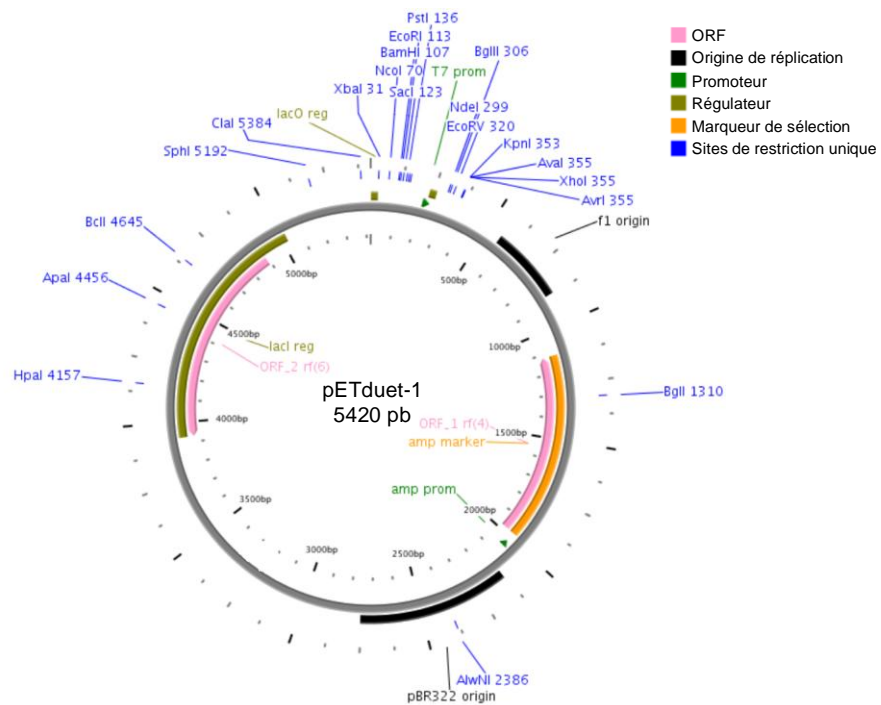
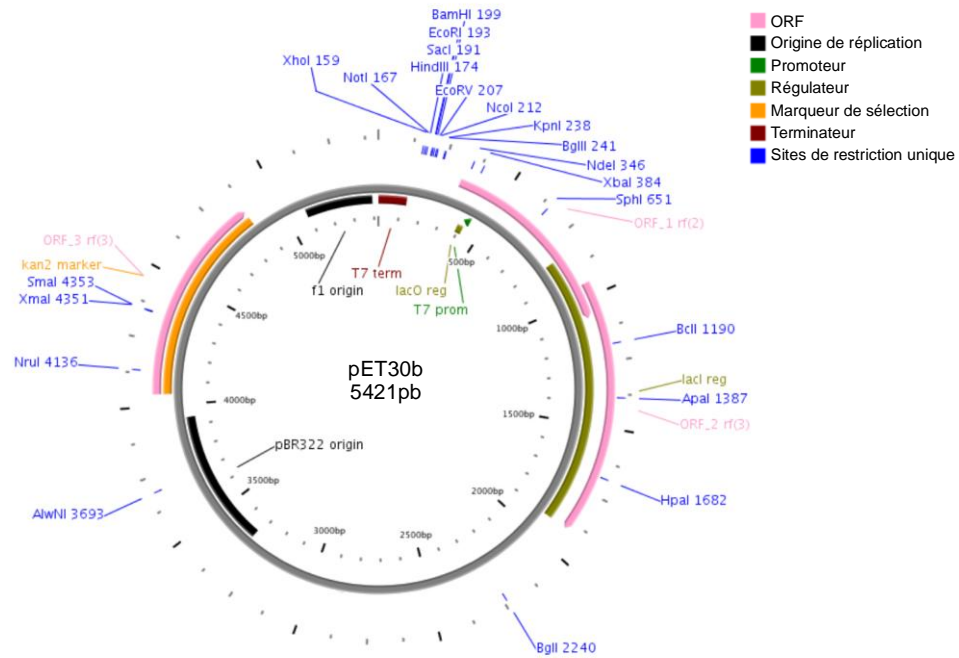
Annexe 3

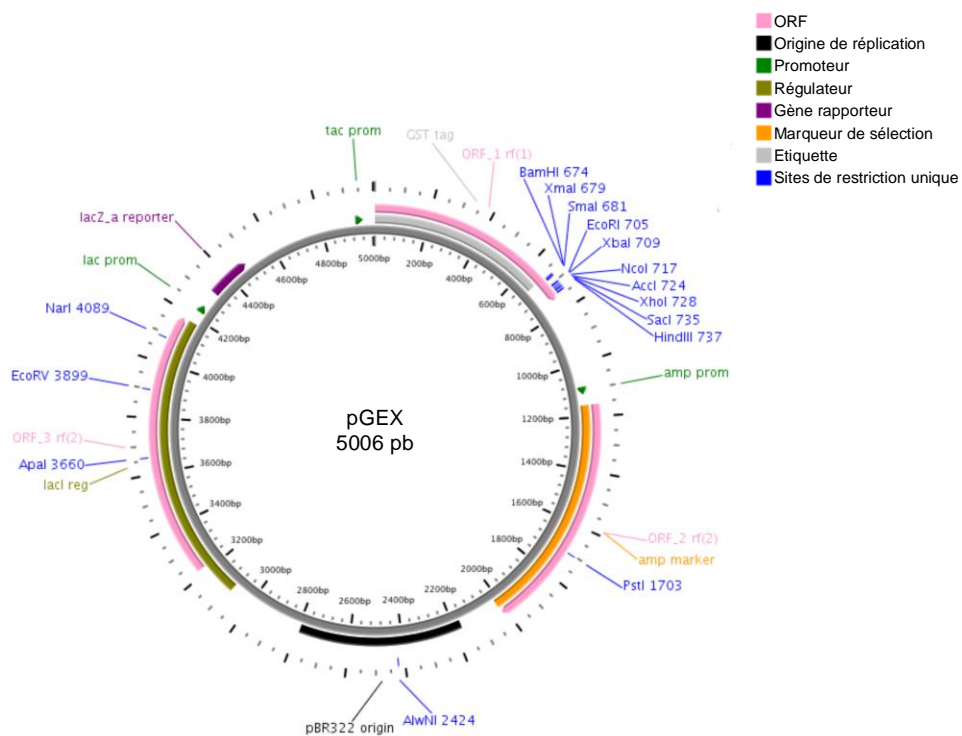
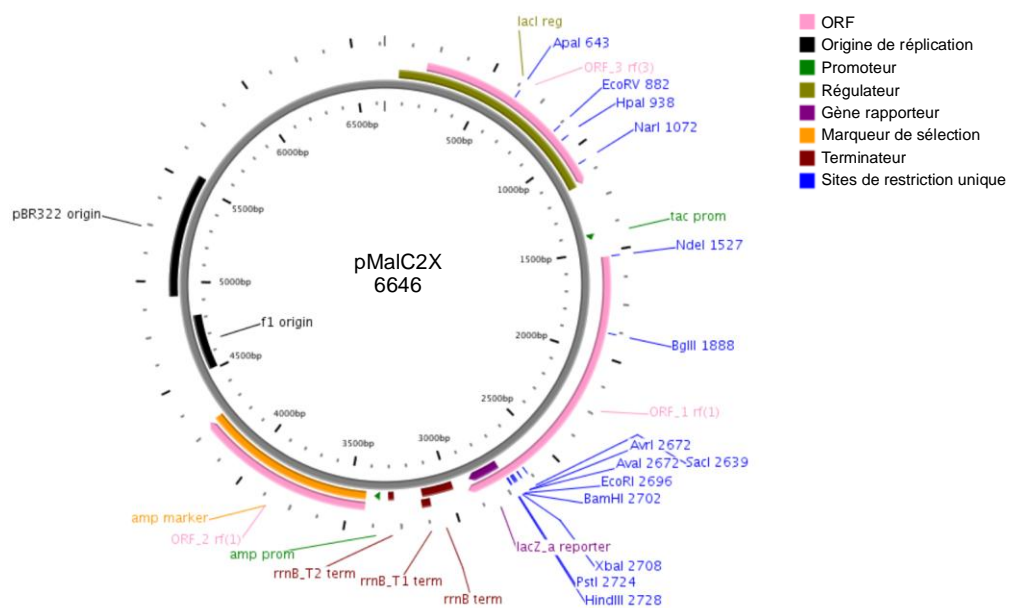
Vecteurs utilisés pour les transformations dans *Dictyostelium*



Annexe 4

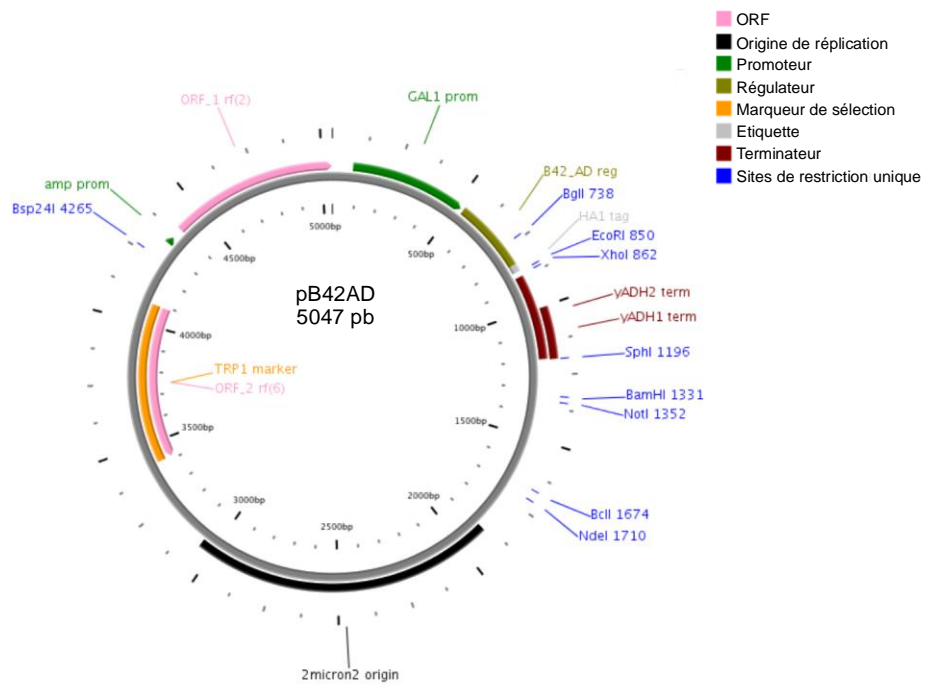
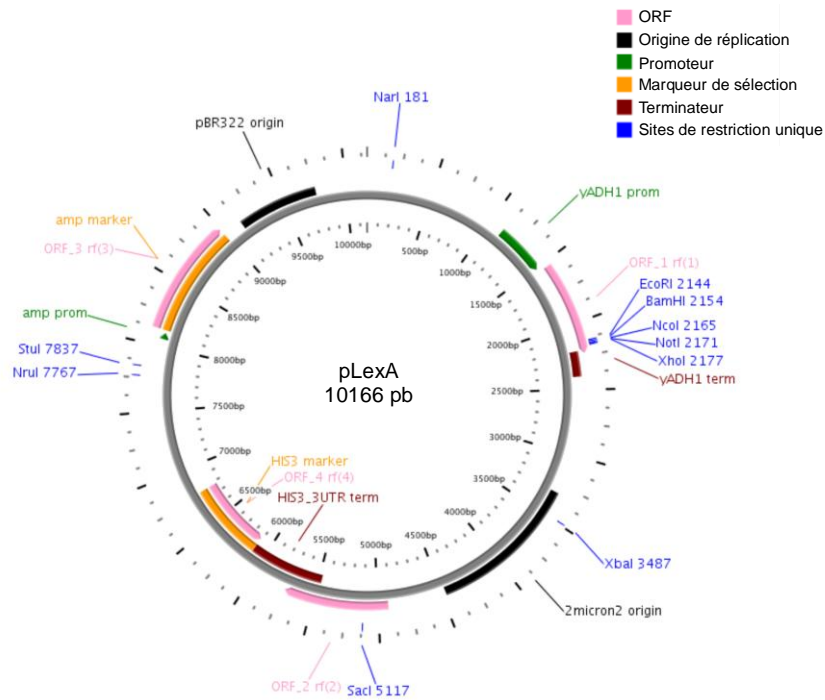
Vecteurs utilisés pour les transformations chez *E. coli*





Annexe 5

Vecteurs utilisés pour le double hybride



LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

1	Alignement des séquences des quatre arrestines et β -arrestines humaines	8
2	Schéma des voies d'activation et de désensibilisation d'un récepteur couplé aux protéines G	10
3	Représentation schématique du cycle des RCPG.....	11
4	Activation de l'arrestine par interaction avec un RCPG.....	13
5	Homologie de séquence entre les arrestines et les protéines G hétérotrimériques.....	15
6	L'activation de l'arrestine par interaction avec un RCPG permet le recrutement de la machinerie d'endocytose	17
7	Résumé des voies de signalisation régulées par les arrestines	21
8	L'arrestine sert de plate-forme secondaire de signalisation	22
9	Les β -arrestines interviennent dans la régulation de la signalisation développementale	24
10	Comparaison de la structure tridimensionnelle l'arrestine visuelle et de la β -arrestine 1	28
11	Interaction avec l'IP6 et formation d'oligomères de β -arrestine 1	34
12	Modélisation des structures tridimensionnelles des protéines humaines de la famille des arrestines.....	36
13	Cladogramme des Eucaryotes	41
14	Cycles de <i>D. discoideum</i>	43
15	Représentation schématique des six arrestines présentes chez <i>D. discoideum</i>	73
16	Séquence nucléique et protéique et prédiction de la structure secondaire d'AdcA	76
17	Structure de la protéine AdcA modélisée à partir de la structure cristallographique de la β -arrestine 1 de bœuf.....	77
18	Représentation schématique de l'organisation du domaine H	78
19	Représentation schématique de l'organisation du domaine Φ	79
20	Domaine FYVE d'AdcA	80
21	Occurrence d'homologues d'AdcA chez d'autres espèces.....	82
22	Occurrence d'homologues des AdcA-F.....	84
23	Validation des anticorps anti-AdcA.....	85
24	Expression d'AdcA au cours du développement.....	87
25	Fractionnement subcellulaire de la protéine AdcA	88
26	Localisation endocytaire d'AdcA.....	89
27	Localisation d'AdcA sur les endosomes précoces.....	91
28	AdcA est exclue des lysosomes et des post-lysosomes	92
29	AdcA est enrichie sur les endosomes dès leur fermeture	93
30	Purification de la MBP et de MBP-FYVE.....	94
31	Le domaine FYVE d'AdcA interagit avec le PI(3)P	95
32	L'association d'AdcA avec les membranes dépend du pH du milieu.....	96
33	Le domaine FYVE est nécessaire à la localisation membranaire d'AdcA	97
34	Boucle d'insertion membranaire (MIL ou turret loop) des domaines FYVE.....	97
35	Importance des domaines FYVE et H Φ dans la localisation subcellulaire d'AdcA	99
36	Le cœur arrestine AdcA-NC _{GFP} n'est pas localisé sur le centrosome.....	100
37	Purification du domaine H	100
38	Le domaine H expose des zones hydrophobes en présence de métal	101
39	L'exposition par le domaine H de zones hydrophobes en présence de nickel est réversible	102
40	Le domaine H forme des oligomères de façon métal dépendante	103
41	Le domaine H oligomérisé en présence de métaux de transition.....	104
42	Affinité apparente d'oligomérisation du domaine H	105
43	Tamassage de la protéine AdcA sur une colonne de Sephacryl S300. Effet de l'addition d'un chélateur	106
44	AdcA forme des homo-oligomères dans la cellule.....	107
45	Contrôle de l'inactivation de <i>adcA</i> et sélection des souches	110
46	Contrôle de l'inactivation du gène <i>adcD</i>	111
47	Croissance et développement des souches KAx-3 et <i>adcA</i> nulle.....	112

48	Capacités pinocytaire et phagocytaire des cellules de la souche <i>adcA</i> nulle	114
49	Le mutant <i>adcA</i> nul présente un défaut de recyclage précoce.....	115
50	Quantification des macropinosomes p25-positifs	116
51	Contrôle de l'expression de l'appât AdcA-NC	121
52	Cycle d'activation de la protéine Arf6	123
53	ArfA de <i>Dictyostelium</i> est un homologue d'Arf1	124
54	Le domaine C arrestine d'AdcA interagit avec ArfA.....	125
55	Localisation subcellulaire de la protéine ArfA de <i>Dictyostelium</i>	127
56	Pull-down de partenaires de AdcA _{GFP}	128
57	Proposition d'un mécanisme modèle pour le fonctionnement de la protéine AdcA	139
58	Proposition d'un mécanisme modèle pour le fonctionnement de la protéine AdcA incluant certains des partenaires potentiels identifiés en double hybride et en pull down	142

Tableau	Page
I Composition du milieu de culture de <i>Dictyostelium discoideum</i>	51
II Composition du milieu Luria Broth.....	52
III Composition des milieux SM+ et SM+/3.....	52
IV Composition du milieu YPD pour la culture des levures.	68
V Composition du mix d'acide aminé pour la sélection des plasmides en milieu minimum.	68
VI Composition du milieu minimum pour la sélection de plasmide de levures.	68
VII Matrice d'identités/homologies entre AdcA-E de <i>Dictyostelium</i> , les arrestines humaines Arrb1 et ArrS, l'arrestine de levure PalF et les protéines à domaine arrestine humaines Adc1 et VDUP	74
VIII Liste des constructions utilisées dans ce travail	86
IX Récapitulatif des interactants obtenus dans un crible double-hybride.....	121
X Souches et anticorps utilisés pour les expériences de pull-down.....	128
XI Identification par spectrométrie de masse des partenaires d'AdcA précipités par pull-down	130

PUBLICATIONS

Dorian Guetta

Parallel changes in global protein profiles during long-term experimental evolution in *Escherichia coli*.

Pelosi L, Kühn L, Guetta D, Garin J, Geiselmann J, Lenski RE, Schneider D.

Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Abstract

Twelve populations of *Escherichia coli* evolved in and adapted to a glucose-limited environment from a common ancestor. We used two-dimensional protein electrophoresis to compare two evolved clones, isolated from independently derived populations after 20,000 generations. Exceptional parallelism was detected. We compared the observed changes in protein expression profiles with previously characterized global transcription profiles of the same clones; this is the first time such a comparison has been made in an evolutionary context where these changes are often quite subtle. The two methodologies exhibited some remarkable similarities that highlighted two different levels of parallel regulatory changes that were beneficial during the evolution experiment. First, at the higher level, both methods revealed extensive parallel changes in the same global regulatory network, reflecting the involvement of beneficial mutations in genes that control the ppGpp regulon. Second, both methods detected expression changes of identical gene sets that reflected parallel changes at a lower level of gene regulation. The protein profiles led to the discovery of beneficial mutations affecting the *malT* gene, with strong genetic parallelism across independently evolved populations. Functional and evolutionary analyses of these mutations revealed parallel phenotypic decreases in the maltose regulon expression and a high level of polymorphism at this locus in the evolved populations.

PMID: 16702438 [PubMed - indexed for MEDLINE]PMCID: PMC1569701

The two PAN ATPases from Halobacterium display N-terminal heterogeneity and form labile complexes with the 20S proteasome.

Chamieh H, Guetta D, Franzetti B.

Institut de Biologie Structurale, CNRS-CEA-UJF, UMR 5075, 38027 Grenoble, France.

Abstract

The PAN (proteasome-activating nucleotidase) proteins from archaea represent homologues of the eukaryotic 26S proteasome regulatory ATPases. In vitro the PAN complex has been previously shown to have a stimulatory effect on the peptidase activities of the 20S core. By using gradient ultracentrifugation we found that, in cellular extracts, the two PAN proteins from Halobacterium do not form stable high-molecular-mass complexes. Only PAN B was found to associate transiently with the 20S proteasome, thus suggesting that the two PAN proteins are not functionally redundant. The PAN B-20S proteasome complexes associate in an ATP-dependent manner and are stabilized upon nucleotide binding. The two PAN proteins were immunodetected in cellular extracts as N-terminal-truncated polypeptides. RNA-mapping experiments and sequence analysis indicated that this process involved transcript heterogeneities and dual translational initiation mechanisms. Taken together, our results suggest that PAN N-terminal modifications and their intracellular dynamics of assembly/association may constitute important determinants of proteolysis regulation.

PMID: 18215129 [PubMed - indexed for MEDLINE]

The Arrestin Fold: Variations on a Theme

Laurence Aubry^{1,2,3}, Dorian Guetta^{1,2,3} and Gérard Klein^{1,2,3,*}

¹CNRS, UMR 5092, 17 rue des Martyrs, Grenoble, 38054, France; ²CEA, iRTSV, LBBSI, 38054 Grenoble, France and ³Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France

Abstract: Endocytosis of ligand-activated plasma membrane receptors has been shown to contribute to the regulation of their downstream signaling. β -arrestins interact with the phosphorylated tail of activated receptors and act as scaffolds for the recruitment of adaptor proteins and clathrin, that constitute the machinery used for receptor endocytosis. Visual- and β -arrestins have a two-lobe, immunoglobulin-like, β -strand sandwich structure. The recent resolution of the crystal structure of VPS26, one of the retromer subunits, unexpectedly evidences an arrestin fold in this protein, which is otherwise unrelated to arrestins. From a functional point of view, VPS26 is involved in the retrograde transport of the mannose 6-P receptor from the endosomes to the trans-Golgi network. In addition to the group of genuine arrestins and Vps26, mammalian cells harbor a vast repertoire of proteins that are related to arrestins on the basis of their PFAM Nter and Cter arrestin-domains, which are named **A**rrestin **D**omain-**C**ontaining proteins (ADCs). The biological role of ADC proteins is still poorly understood. The three subfamilies have been merged into an arrestin-related protein clan.

This paper provides an overall analysis of arrestin clan proteins. The structures and functions of members of the subfamilies are reviewed in mammals and model organisms such as *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Saccharomyces* and *Dictyostelium*.

Received on: December 16, 2008 - Revised on: December 30, 2008 - Accepted on: January 5, 2009

Key Words: Arrestins, Vps26, GPCR, retromer, trafficking, endocytosis.

TUNING OF RECEPTOR-DEPENDENT SIGNALING BY ARRESTINS

In 1985, visual arrestin, also known as S-antigen or arrestin 1, was discovered in bovine retinal rods, where it controls light-dependent cGMP phosphodiesterase activity [1, 2]. Four mammalian arrestins have now been characterized. These are found either specifically in visual systems (arrestin 1 and arrestin 4 in rods and cones, respectively) or ubiquitously (β -arrestins 1 and 2) (for recent reviews, see [3-6]). They comprise a family of proteins that interact with ligand-activated G-protein coupled receptors (GPCRs). The signaling downstream from the receptors is regulated as a consequence of this interaction, and through the interference of arrestins with the subunits of the heterotrimeric G-proteins. This signaling can be fine-tuned by the internalization of GPCRs in coated vesicles formed by the recruitment of clathrin and adaptor proteins by β -arrestins. GPCR internalization allows either a transient desensitization, when the receptor is rapidly recycled back to the plasma membrane, or a long term desensitization, when targeted to lysosomes for degradation. Additional roles for β -arrestins have recently been unveiled, both with cytosolic partners (interaction with MAP kinases) and in the nucleus (interaction with transcription factors).

Given the way in which GPCRs interact with arrestins (GPCRs respond to a variety of stimuli including hormonal signals, neurotransmitters, chemokines, chemoattractants and

sensory stimuli such as light, odor or taste), the size of the GPCR family (over 1000 different GPCRs in humans) and the novel roles that have been uncovered for arrestins, it would appear that we are just scratching the surface of the potential involvement of the arrestin family in a rapidly expanding list of signaling pathways.

ARRESTINS AND THEIR PARTNERS AS DISCLOSED FROM STRUCTURAL DATA

The crystal structure of visual arrestins and β -arrestins has been determined [7-12]. Both proteins comprise two modules that are related by a pseudo two-fold rotation axis, the N- and C-domains (PFAM signatures PF00339 and PF02752, respectively), which are connected by a flexible loop (Fig. 1A). Each module, based on the type III module (Fn3) originally discovered in fibronectin and later found in IgGs [13], consists of a deeply curved sandwich of two anti-parallel β -sheets. Interestingly, this conserved structure is obtained without any phylogenetic conservation of amino acids. Whether this results from a convergent evolution towards a stable β -sandwich fold or from a common ancestor has not been established.

The C-domain is extended with a flexible C-terminal tail that is buried through interactions with the N-domain and becomes exposed when the arrestin switches from a basal to an activated state. Charged residues from the C-tail, the N-domain and a lariat loop of the C-domain generate a neutral polar core by bridging side chains of opposite charge. This polar core is a critical element for the functioning of arrestins, as it acts as a phosphate sensor and an activation switch (Fig. 1B): the binding of the negatively-charged

*Address correspondence to this author at the iRTSV/LBBSI, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France; Tel: +33 438 784 661; E-mail: gklein@cea.fr

phosphorylated C-terminus of activated GPCRs disrupts the electrostatic interactions within the polar core and triggers a conformational rearrangement of arrestin and the subsequent unmasking of the C-tail. It is at the level of this tail that the two arrestin groups differ. A short stretch in the β -arrestin tail contains clathrin-binding (L[L/I][D/E/N][L/F][D/E], [14, 15]) and adaptin-binding (IVFxxFxRxR, [16, 17]) sites. These sites drive the recruitment of the endocytic machinery and the internalization of the arrestin-bound receptors in clathrin-coated vesicles. Other proteins involved in endocytosis are also scaffolded by arrestins, the monomeric G protein Arf6 and its GEF (ARNO) and GAP (GIT) [18-21]. It has now been demonstrated that β -arrestin 2 serves as a scaffold for endothelial NO synthase that sequentially S-nitrosylates β -arrestin 2 and β 2-adrenergic receptor. The consequences of this are the potentiation of the interaction between β -arrestin 2 and clathrin and adaptor protein AP-2, and receptor internalization [22]. Although visual arrestins that regulate the opsin/rhodopsin family of GPCRs do not contain any identifiable clathrin and AP-2 binding sites in their C-terminal tail, visual arrestins Arr1 and Arr2 from the fruit fly promote clathrin-dependent endocytosis of their rhodopsin in physiological or hyperstimulation conditions [23, 24].

Visual and β -arrestins display apparent selectivity towards their respective physiological receptor(s). However, the existence of a biunivocal correspondence between β -arrestins and receptors cannot be envisioned, as the mammalian genome harbors close to a thousand GPCRs and only a few arrestin proteins. The current hypothesis is that the flexibility of the β -arrestin N-domain helps to accommodate the diverse GPCRs, whereas a rigid visual arrestin N-domain best fits its specialized partner, rhodopsin [8]. This is a matter for debate, as class B GPCRs (see definition below) are able to interact with visual arrestin [25], and cone arrestin can bind non-visual receptors in heterologous expression situations [12]. The affinity of GPCRs for β -arrestins and the duration of this interaction in internalization/recycling vesicles is the basis for dividing receptors into two classes. Class A receptors (including the β 2-adrenergic receptor, μ -opioid receptor and dopamine receptor) are internalized with β -arrestin 2 preferentially, but rapidly lose β -arrestin binding in the early phase of endocytosis, allowing their rapid recycling and resensitization. Class B receptors (including the V2-vasopressin receptor and angiotensin receptor) bind β -arrestin 1 and β -arrestin 2 equally well, maintain a stable association with β -arrestins on the endosomes and recycle slowly. The information that determines whether GPCRs are classified into class A or B is contained in their cytosolic tail. Swapping of the C-terminus of a class A with that of a class B receptor, or vice-versa, converts the GPCR class [26]. The formation of a stable receptor- β -arrestin complex is dependent upon the presence of phospho-serine and -threonine clusters [27]. The detection of the GPCR phosphorylated state by arrestins is mediated by the polar core, and an arrestin mutated by charge inversion in this core binds non-phosphorylated and phosphorylated receptors equally well [28, 29]. The conformational changes in arrestins that are induced by the sensing of the phosphate moiety allow receptor-binding on surfaces located on the concave side of both the N- (β -

strands 5 and 6) and C-domains (β -strands 15 and 16) for both visual arrestin and β -arrestin 1 [30] (Fig. 1C).

It has been proposed that visual and β -arrestin genes from vertebrates arose from gene duplication of an ancestral gene. As Cnidaria is the oldest eumetazoan phylum [31], arrestin genes from the primitive chordate *Ciona intestinalis* [32] or the Cnidaria *Hydra magnipapillata* [33] may be closest to the original arrestin gene.

Phosphoinositols and phosphoinositides appear to be major regulators of visual and non-visual arrestins in their inactive and active states, respectively. Phytic acid (inositol hexakisphosphate, InsP_6) regulates the oligomerization state of the arrestins, their subcellular location and their interaction with receptors [10, 34, 35]. The concentration of InsP_6 in cell lines and tissues is generally high, within the 10-100 μM range. Taking into account the affinity of β -arrestin for InsP_6 of between 50 nM and 1 μM , suggests that cytosolic basal-state arrestin is mostly stored in an oligomeric InsP_6 -bound form. Non-visual arrestins bind InsP_6 in two low- and high-affinity sites that are located in the N- and C-domains of the arrestins, respectively (Fig. 1C). Both InsP_6 binding sites are defined by positive residues patches [10, 11]. The high-affinity InsP_6 binding residues (K^{233} , R^{237} , K^{251} in human β -arrestin 2) are located on the concave surface of the C-domain, also interacting with the phosphorylated GPCR [11]. The possibility that the arrestin-GPCR interaction is modulated by InsP_6 can thus be envisioned. The C-domain site is also able to bind membrane-embedded phosphoinositides, with the highest affinities for $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ and $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. Mutations in this binding site impair β 2-adrenergic receptor endocytosis [36]. Phosphoinositides may act as co-receptors for coincidence detection, increasing the binding affinity/selectivity of activated arrestins for a phosphorylated GPCR.

EMERGING AREAS IN β -ARRESTIN SIGNALING

Extending the List of Arrestin-Regulated Cargoes

Data from different biological models now demonstrate that the role of arrestins is not restricted to serpentine receptors [37, 38], but includes single transmembrane-domain receptors with or without tyrosine kinase activity (type III TGF- β receptor, insulin-like growth factor I receptor, Notch and inhibitory killer-cell immunoglobulin-like KIR receptor), 12-membrane spanning transporter (Na^+/H^+ exchanger NHE5) or voltage-dependent cation channel (calcium channel $\text{Ca}_v1.2$) [39-45]. Three elements in the concave N- and C-domains of β -arrestin 2 interact with NHE5 [41]. Interestingly, the first binding site (residues 52-78) corresponds to the conserved β -strand 5 required for GPCR binding [30]. Whether phosphorylation of NHE5 is a prerequisite for β -arrestin binding has not yet been fully elucidated. In natural killer cells, β -arrestin 2 interacts with KIR engaged with ligands. Interaction necessitates the tyrosine phosphorylation of consensus immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM) in KIR's cytoplasmic tail. This interaction facilitates the recruitment of SHP-1 and -2 phosphatases into a ternary complex that transduces an inhibitory signal abrogating the signal arising from activating receptors [45, 46].

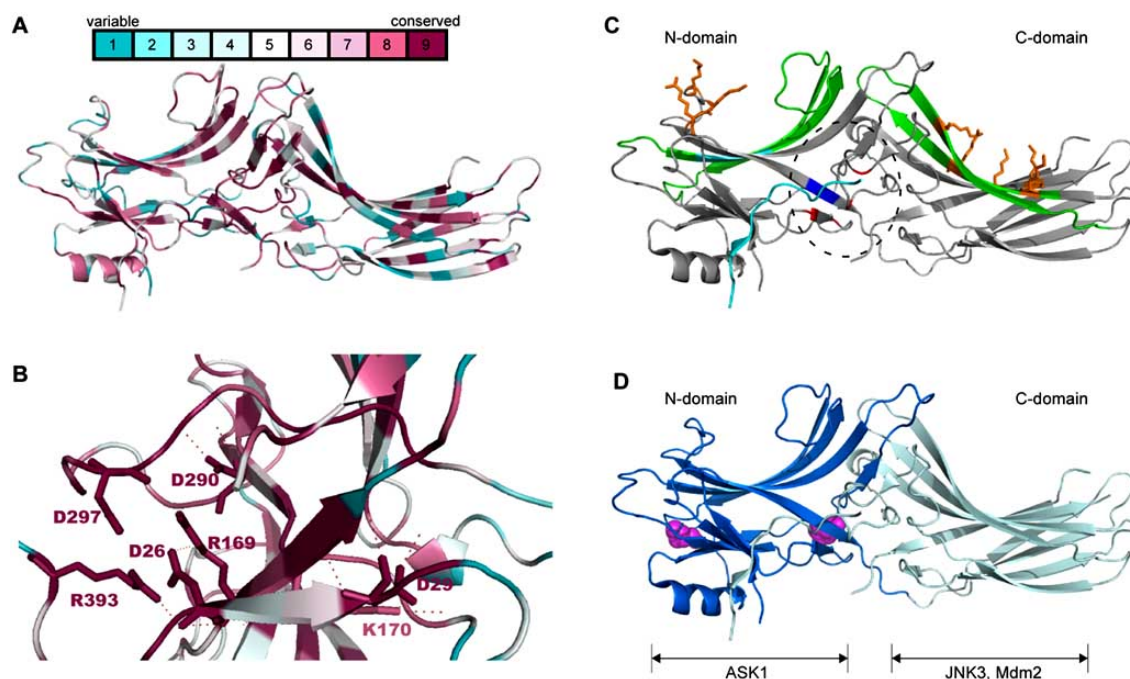


Fig. (1). Residue conservation among members of the arrestin family. Localization of binding sites on β -arrestins.

A. Amino acid conservation in human rod and cone arrestins and β -arrestins 1 and 2 was calculated with the online Consurf software (<http://consurf.tau.ac.il>) and represented with PyMol using Consurf coloring (see scale) on β -arrestin 1 template (1ZSH). **B.** Blowup of the polar core showing the high conservation of the residues important for the polar core highlighted as sticks. Electrostatic bonds between core residues are indicated as dotted lines. **C.** The structure of β -arrestin 1 (PDB 1ZSH) is represented with the PyMol software. The localization of the polar core is indicated by a dashed ellipse with positive residues in blue and negative residues in red. Receptor binding β -strands are indicated in green. The adaptin AP-2 binding site is indicated in cyan. Low- and high-affinity binding sites for InsP_6 in the N- and C-domains, respectively, are indicated as orange sticks. **D.** The N- and C-domains of β -arrestin 2 (PDB 1JSY) are indicated in dark and light blue, respectively. Prolines involved in Src binding appear as magenta spheres. The binding domains of ASK1, JNK3 and Mdm2 are indicated.

Extending the List of Arrestin Sites of Action

Recent literature indicates that arrestins are not solely used to squelch receptor-dependent signaling at the plasma membrane. Their role is increasingly comparable to that of heterotrimeric G-proteins, as they act as a secondary signaling platform on the endosomes. Thus they bind c-Src, various MAPKs, PI3K and Akt as well as non-kinase partners such as the cytoskeletal component RhoA (Fig. 1D) [11]. In the cytosol, β -arrestins also interact with MDM2 and I κ B α , and thereby indirectly regulate p53- and NF κ B-dependent transcription [47]. The nuclear functions of arrestins have also been documented recently [3]. Both β -arrestins translocate to the nucleus and interact with transcription factors p300 and cAMP-response element-binding protein (CREB) [47]. Furthermore, β -arrestin 1 negatively regulates the transcription factor STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1). When the antiviral cytokine interferon- γ binds its receptor, it activates the phosphorylation of STAT1, inducing its dimerization, translocation to the nucleus and transcriptional activity. β -arrestin 1 promotes the dephosphorylation of STAT1 by recruiting the tyrosine phosphatase TC45 in a ternary complex with STAT1, thereby turning off STAT1 and reducing interferon- γ -induced gene transcription. It should be noted that this effect is not observed with

β -arrestin 2, though it can bind STAT1, possibly due to a difference in its nucleocytoplasmic shuttling [48, 49]. Indeed, the presence of a functional NES in the C-domain of β -arrestin 2 (³⁸⁸FEDFARLRL³⁹⁶ sequence), which is absent in β -arrestin 1, prevents its nuclear accumulation. This nucleocytoplasmic shuttling leads to the cytosolic location of c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) when the kinase is docked on the ¹⁹⁶RRSLHL²⁰¹ sequence in the C-terminus of β -arrestin 2 [50].

β -arrestin 2, and not β -arrestin 1, is located at the centrosome in both interphasic and mitotic cells, but is not involved in the classical functions of the centrosome, such as nucleation and anchoring of microtubules. Lack of β -arrestin 2 correlates with a reduction in primary cilium formation and cell cycle deregulation [51]. Upon primary cilium formation in fibroblasts, β -arrestin 2 is translocated to the axoneme [51]. Its role there is connected with the Smoothed serpin protein (Smo) in the Hedgehog (Hh) pathway. Smo is inhibited by Patched (Ptc), a 12 transmembrane-spanning protein. Binding of Hh to Ptc relieves the inhibition of Smo, and this event constitutes the initiation step of the developmental processes. Phosphorylation of Smo by GRK2 induces the recruitment of β -arrestin 2 and the endocytosis of Smo in clathrin-coated vesicles [52]. Once activated, Smo regulates

the expression of Hh target genes by controlling the activity of the Glioma-associated oncogene homologue (Gli) [53]. It has now been demonstrated that β -arrestins 1 and -2 promote the interaction of activated Smo with the kinesin motor protein Kif3A, the subsequent movement of Smo into the primary cilium mediated by components of the intracellular transport complex, the production of the activator form of the Gli transcription factor and gene expression [54, 55].

THE ARRESTIN FOLD, A WIDELY USED MOLECULAR ARCHITECTURE

Vps26

Interestingly, the arrestin-fold is also shared by an apparently unrelated protein, Vps26, which is present in humans as two isoforms, Vps26A and Vps26B [56, 57] (Figs. 2 and 3). Vps26 is a subunit of a large multimeric complex, termed a retromer, which is located on early/recycling endosomes in mammals and which mediates the retrograde transport of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR) and its yeast homologue Vps10 from the endosomes to the Golgi apparatus. The retromer comprises two sub-complexes. The Vps26/Vps29/Vps35 subcomplex is involved in cargo-recognition and loading. The second subcomplex is made up of sorting nexins (SNX) that participate, *via* their PX and BAR domains, in the location of the retromer on PtdIns(3)P-rich highly curved membranes of early and recycling endosomes [58-60]. Vps26 interacts with both Vps35 and SNX1.

At present, it is not known whether the structural similarities between Vps26 and the arrestin families correlate with the existence of a functional kinship beyond their role in trafficking processes. In both families, polar and electrostatic contacts play a key role in interdomain interactions.

However, when compared to arrestins, the polar core of Vps26 involves different side chains and is generated by distinct secondary structure elements. Mutations of polar core residues in Vps26 do not interfere with either its endosomal location in human cells or with CPY sorting in yeast, thus calling into question its role in the activation step and/or the function of Vps26 [57]. In the retromer complex, the position of Vps26 relative to the neighboring subunits may allow access to the concave surface by target cargoes. So far, however, only the Vps35 subunit has been shown to bind cargoes within the retromer.

DSCR3

The human genome harbors the DSCR3 gene encoding a protein belonging to the arrestin clan (see definition below) (Fig. 3). Interestingly, it has been predicted that human DSCR3 contains overlapping PFAM PF00339 (Arrestin, N-terminal domain, E-value 1.9×10^{-3}) and PFAM PF03643 (Vps26, E-value 1.1×10^{-155}) domains. Thus, DSCR3 shares sequence kinship with both arrestins and Vps26 proteins and represents an intermediate link between these two families. The full-length structure of DSCR3 can be modeled by homology (Fig. 2) using the crystal structure of Vps26 (PDB 2fauA) as a template. DSCR3 belongs to the subset of about 20 genes located within locus 21q22, called the **Down Syndrome Critical Region** [61], which is involved in the partial or full trisomy of chromosome 21 that is responsible for Down syndrome. Up to now, DSCR3 attracted only a little biochemical interest. Because DSCR3 protein is found in the nucleus, a transcriptional regulation function has been proposed for it [62]. A possible role for DSCR3 and 3 other chromosome 21 trisomy proteins from the DSCR region in a mitogen-activated protein kinase pathway has been predicted on the basis of a computational approach [63].

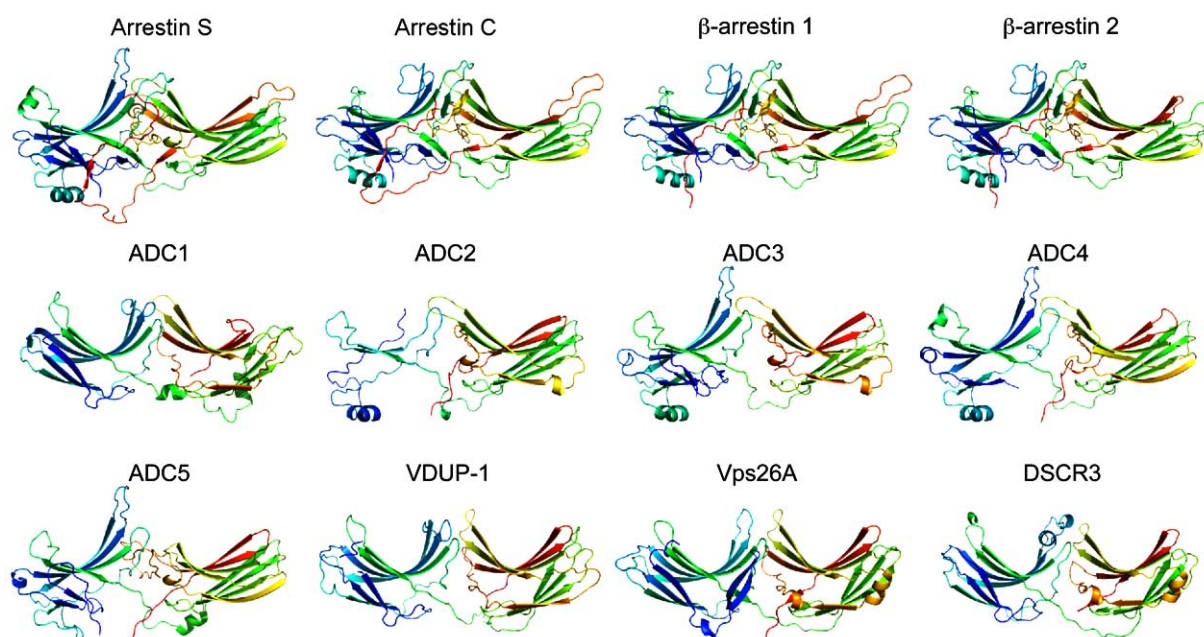


Fig. (2). 3D-structure of human arrestin clan proteins.

The structure of human arrestin clan proteins was modeled with the Phyre software (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) and visualized with the Pymol software (<http://www.pymol.org>). The PDB templates used for the modeling were 1CF1 for arrestin S, ADC2, ADC3, ADC4 and ADC5, 1JSY for β -arrestin 1, β -arrestin 2 and arrestin C, 2FAU for ADC1, VDUP, Vps26A and DSCR3.

Arrestin-Domain Containing Proteins (ADC)

Genes encoding arrestin-domain containing proteins (ADCs) that harbor N and/or C arrestin domain PFAM signatures have been pinpointed in mammalian genomes. Their identity/homology scores with arrestins are, however, very low (11-15% identity with arrestins). In a phylogenetic tree (Fig. 3), ADCs branch away from arrestins, as expected from the poor sequence conservation. The structure of all ADCs can be modeled by homology using the structure of crystalized arrestins (Fig. 2). It should be noted that the interface between the modeled N- and C-domains does not seem to involve positively and negatively charged amino acids. Data pertaining to the cellular function of these ADCs are scarce. One of them, VDUP-1, is a gene, the mRNA of which increases 4-5 fold upon treatment of HL60 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [64]. In a yeast two-hybrid screen, VDUP-1 has been shown to interact with thioredoxin [65, 66] and hence to regulate the redox state of the cell [67, 68]. Suppression of thioredoxin activity by VDUP-1 has antiproliferative and apoptotic effects [69]. The expression of ADC2 has been shown to respond to lysergic acid diethylamine in rat and the gene was therefore named *ILAD-1* (induced by lysergic acid diethylamine) [70].

Altogether, visual and β -arrestins, arrestin-domain containing proteins (ADCs) and arrestin-fold proteins (Vps26 + DSCR3) make up a clan of proteins sharing the same structure. Hereafter, they will be referred to as arrestin clan proteins. Alvarez recently suggested that arrestin clan proteins be classified into two subfamilies, the β -class arrestins (visual and β -arrestins) and the α -class arrestins (ADCs), on the basis of the following characteristics: 1) β -arrestins possess a short α -helix in their N domain that is missing in α -arrestins; 2) α -arrestins harbor WW domain-binding motifs (P/L)PxY, but β -arrestins do not. Vps26 proteins are classified as α -arrestin-like [33]. As defined here, these criteria do not seem robust enough to define two subfamilies among human arrestin clan proteins because, firstly, the modeling of ADC2, ADC3, ADC4 predicted by Alvarez as α -arrestins yields a structure of β -arrestins with the characteristic α -helix I in their N domain (Fig. 2) and secondly, ADC5, defined as a putative α -arrestin on the basis of the absence of helix I, does not harbor any (P/L)PxY motif either.

VARIATIONS IN OTHER MODELS

Alternative models were studied soon after the discovery of vertebrate arrestins and important roles established in flies or chordates. Data now extend to unicellular eukaryotes.

Drosophila melanogaster

Visual arrestins 1 and 2 were quickly described in *Drosophila* [71-73] after the discovery of arrestin in bovine retinal rods. Arrestins 1 and 2 are expressed in fruit fly photoreceptor cells. Binding of arrestin 2 to rhodopsin is not dependent on its phosphorylation, whereas arrestin 1 is recruited on phosphorylated rhodopsin. This latter interaction promotes light-induced rhodopsin endocytosis. Arrestin 1 is also required for light-independent photoreceptor survival [24].

More recently, a nonvisual arrestin, Kurtz, has been shown to be an essential neural gene in *Drosophila* [74]. In

an arrestin-translocation assay, Kurtz binds amine and various peptide receptors in response to ligand stimulation. Kurtz null mutants are hypersensitive to osmotic stress, involving an as yet unknown GPCR desensitization in the stress response [75]. Kurtz downregulates the Notch cell surface receptor, a single transmembrane protein carrying EGF-like repeats that, together with its ligand Delta, determines the ectodermal or neuronal fate of cells. Kurtz is able to complex Deltex, a E3 ubiquitin ligase. Deltex, in a ternary complex with Notch and Kurtz, will ubiquitinate the intracellular domain of Notch. The outcome of this ubiquitination is the degradation of Notch, possibly by the proteasome [44, 76].

Work on *Drosophila* and on the nematode *Caenorhabditis elegans* (see below) has revealed the essential role of a traffic loop involving Vps26 and the retromer machinery during development. This role is conserved during mouse embryogenesis [77]. Important clues for the understanding of the regulation mechanism of Wg/Wnt secretion by the retromer have now been produced in fruit fly experiments in which Vps26 and Vps35, two subunits of the retromer, are eliminated by RNA-interference. The Wingless (Wg) morphogen is normally carried from the Golgi apparatus to the cell surface by Wntless (Wls), a multi-pass transmembrane protein that acts as a Wg cargo receptor. Once unloaded, Wls is recaptured by endocytosis and recycled to the trans-Golgi network by the retromer complex. In the absence of a functional retromer, Wls is targeted to the lysosome and degraded, thereby preventing Wls to direct Wg/Wnt secretion [78-80].

In addition, the fruit fly repertoire of arrestin clan proteins includes a DSCR3 protein, 14 ADCs and an uncharacterized branch, NP_727419. This gene encodes a long isoform (804 aa) branching off before the divergence of arrestins 1 and 2 and Kurtz (Fig. 3).

Caenorhabditis elegans

The repertoire of nematode arrestin clan proteins comprises a single arrestin, a Vps26 protein and a crown of ADC proteins (Fig. 3). The presence of some minor branches may be due to not yet stable entries in the databases. ARR-1, the sole genuine arrestin encoded by the nematode genome, is highly similar to fruit fly Kurtz. While the disruption of the G protein-coupled receptor kinase 2 (*grk-2*) gene strongly affects chemotaxis, disruption of ARR-1 does not perturb chemosensation, which is a paradox, since GRKs and arrestins cooperate in the regulation of receptor-dependent signaling [81]. ARR-1 is dispensable in development, but has been shown to regulate olfactory adaptation and recovery. The C-terminal domain harboring a conserved clathrin-binding box (LIQLH) and a β 2-adaptin binding box (FxxxR), is essential to promote internalization of the β 2-adrenergic receptor when nematode ARR-1 is expressed in HEK293 cells [82].

The first evidence that the retromer is involved in the trafficking of Wntless was provided by studies on *C. elegans*. The retromer functions in the formation of a gradient for EGL-20, the nematode ortholog of Wnt, as disclosed by RNA-mediated interference against *vps35*, *vps29* and *vps26*, and regulates neuronal polarity [83, 84].

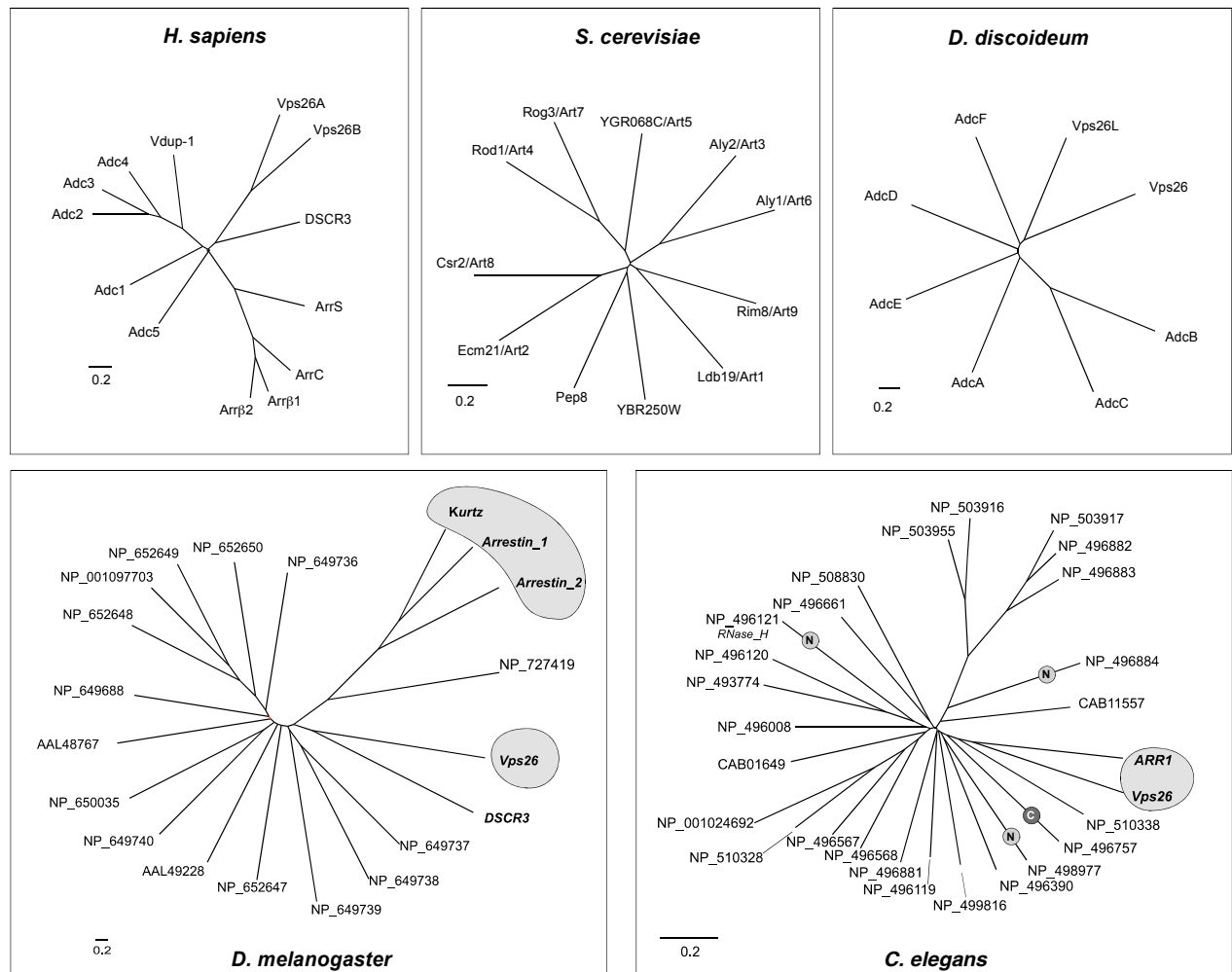


Fig. (3). Diversity of arrestin clan proteins in human, fruit fly, nematode, yeast and amoeba.

Sequences of human arrestin clan proteins were aligned with ClustalW software [102]. An unrooted phylogenetic tree was drawn with Tree-Dyn for each species (<http://www.phylogeny.fr>) [103, 104]. Labels in the nematode tree indicate genes in which only the arrestin N- or C-domain was found. A grey cloud highlights proteins in nematode and fruit fly for which literature is available.

The NP_496121 gene encodes a fusion protein of the N-domain of arrestin and RnaseH. No data are available for the arrestin-domain containing proteins.

Saccharomyces cerevisiae

Until recently, arrestins were thought to be restricted to metazoa. The fungi *Aspergillus nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae* also harbor arrestin-related proteins involved in the response to various stresses involving either pH, chemicals or heavy metals. Eleven candidates are found in *S. cerevisiae*, which is responsible for the **R**esistance of yeast to **o**-**d**initrobenzene (Rod1p and Rog3p), involved in the response to alkaline ambient pH (Rim8/PalF) or cadmium (Ecm21 and Csr2) or interacting with the autophagic machinery (Aly1p and Aly2p) (Fig. 3) [85-92]. Although not all candidates share the following properties throughout, they generally contain the PFAM N- and C-domains of arrestins and the WW-binding sequences PPXY, criteria that have been proposed for the α -arrestins. These "PY" sites allow yeast arrestins to bind the HECT-type ubiquitin ligase Rsp5 and to be ubiquitinated by it. Phosphorylation of arrestins and of the

regulated GPCR(s) is an important regulation step in mammals. Rod-1 is phosphorylated by Snf1-kinase and the kinase activity is important for drug resistance [91]. Aly2p is phosphorylated by Cdk1 [93]. PalF in *A. niger* and Ecm21 in *S. cerevisiae* promote the internalization of the pH sensor PalH or the yeast manganese transporter Smf1, respectively [87, 90].

Three genes loosely related to arrestins complete the repertoire of yeast arrestins: YGR068C, Ldb19 (low dye binding) and YBR250W. YBR250W/Spo23 is a member of the yeast sporulation pathway [94]. The null mutant is viable and has no sporulation defect [94, 95]. All of these genes except YBR250W have been renamed arrestin-related trafficking adaptors (ARTs). ART1 (formerly Ldb19) and ART2 (Ecm21) are used as scaffolds for the recruitment of the ubiquitin ligase Rsp5 in the neighborhood of their target cargoes, a step that is followed by ubiquitination and endocytosis of the cargoes [96]. All yeast ARTs may function as scaffolds for the endocytosis of plasma membrane proteins, in response to environmental stresses.

Pep8 is the genuine yeast Vps26. It has been demonstrated that it forms the retromer complex with Vps35, Vps29, Vps17 and Vps5 [97] and bridges the cargo-binding protein Vps35 and the membrane deformation subcomplex Vps5/Vps17 [98]. Pep8 is essential for the correct sorting of carboxypeptidase Y to the vacuole [99]. The retromer cooperates in endosomal cargo retrieval back to the Golgi apparatus with BTN2, the yeast homolog of mammalian Hook1, through the direct interaction of BTN2 with Vps26 [100].

Dictyostelium discoideum

The unveiling of PalF and more recently Ecm21, two fungal proteins with arrestin domains and functions, prompted us to screen for whether other unicellular eukaryotes, in particular the amoeba *Dictyostelium discoideum*, code for proteins of the arrestin clan. A total of eight candidates were found in *D. discoideum* (Fig. 3). Most obviously, hits for Vps26 and DSCR3 were identified on the basis of their strong conservation with human orthologs ($1e^{-109}$ expect value and 55% identity for DDB_G0269168/Vps26; $7e^{-94}$ expect value and 56% identity for DDB_G0292212/DSCR3) (Fig. 3). As for the human protein, amoebal DSCR3/Vps26L has a Vps26 PFAM domain that overlaps in its first half with an arrestin C-domain.

Besides these 2 proteins, 6 candidates harbor either both arrestin N- and C domains (AdcA, -B, -C, -D, -F) or the C-domain only (AdcE). Interestingly, most arrestin-related proteins from *Dictyostelium* exhibit new pairings of known domains. They are extended on both sides of the arrestin core, with consensus protein-protein interaction domains (SAM, MIT, LIM) or protein-phospholipid interaction domains (FYVE and C2) (Fig. 4). Such a domain organization is also found in *Entamoeba histolytica* arrestins and seems to be

limited to Amoebozoae. The presence of C2 and FYVE domains may indicate that ancient arrestins have targeted functions at the plasma membrane and the endosome, respectively. Interestingly, AdcA has also been found in the protein inventory of the centrosome [101] as has β -arrestin 2 in fibroblasts.

AdcB, AdcC and AdcD harbor “PY” sequences outside their arrestin core (AdcA: PPVY; AdcC: LPRY) or within the arrestin N-domain (AdcD: LPKY) as do mammalian α -arrestins and yeast ARTs, which may serve to recruit a HECT domain-containing ubiquitin ligase. The structure of whole AdcA, AdcB and Vps26 has been modeled by homology on the structure of crystalized arrestin S or Vps26A. It shows the general conserved structure of arrestins with an α -helix in the N-domain of AdcA as do visual and non-visual arrestins. Unexpectedly, the modeled structure of AdcA does not exhibit a polar core with opposite-charged residues able to act as the sensor for a phosphorylated receptor, suggesting a different mode of activation.

CONCLUSION

The arrestin clan comprises proteins, visual and non-visual arrestins, arrestin-domain containing (ADC) proteins, the retromer subunit Vps26 and DSCR3, which share a common structure. In invertebrates, members of all subfamilies can be found with at least a β -arrestin, a visual arrestin when the organism has eyes or ocelli (*Drosophila*, *Ciona*), Vps26 and DSCR3, and a broad representation of ADC proteins. Arrestin clan proteins have also been found in unicellular eukaryotes (yeast and *Dictyostelium*). In most cases where studies have been performed, arrestin clan proteins have been linked to intracellular trafficking, though they belong to different machineries in different cellular loca-

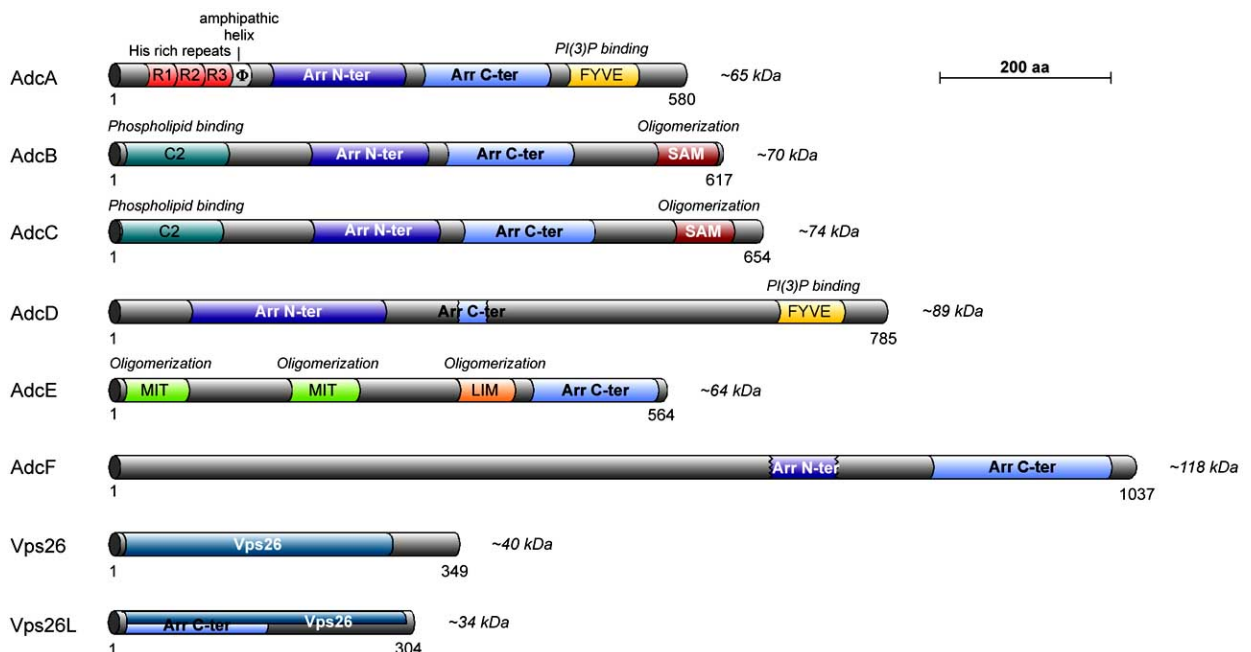


Fig. (4). Domain organization of *Dictyostelium* arrestin clan proteins.

Dictyostelium arrestin-domain proteins (Adcs), Vps26 and Vps26L/DSCR3 are represented by their colored domains as indicated. Number of amino acids and molecular masses of each protein are indicated. The functions of each domain are indicated on top.

tions. This points towards the existence of different functions for proteins built on a conserved structure, in which the 3D-structure is essential for scaffolding the various affiliates.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Commissariat à l'Energie Atomique, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Joseph Fourier Grenoble, the Ministère pour la Recherche et la Technologie (ACI Biologie du Développement et Physiologie Intégrative) and by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche). The authors would like to thank Gérard Brandolin and Guy Lauquin for introducing us to the Consurf software.

REFERENCES

- Zuckerman, R., Buzdygon, B., Philp, N., Liebman, P., Sitaramayya, A. Arrestin: an ATP/ADP exchange protein that regulates cGMP phosphodiesterase activity in retinal rod disk membranes (RDM). *Biophys. J.* **1985**, *47*: 37a.
- Zuckerman, R., Cheasty, J.E. A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett.* **1986**, *207*: 35-41.
- DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*: 483-510.
- Gurevich, E.V., Gurevich, V.V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **2006**, *7*: 236.
- Moore, C.A., Milano, S.K., Benovic, J.L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*: 451-482.
- Premont, R.T., Gainetdinov, R.R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*: 511-534.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Buldt, G. X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* **1998**, *391*: 918-921.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B., Schubert, C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* **2001**, *9*: 869-880.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., Sigler, P.B. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **1999**, *97*: 257-269.
- Milano, S.K., Kim, Y.M., Stefano, F.P., Benovic, J.L., Brenner, C. Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*: 9812-9823.
- Milano, S.K., Pace, H.C., Kim, Y.M., Brenner, C., Benovic, J.L. Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* **2002**, *41*: 3321-3328.
- Sutton, R.B., Vishnivetskiy, S.A., Robert, J., Hanson, S.M., Raman, D., Knox, B.E., Kono, M., Navarro, J., Gurevich, V.V. Crystal structure of cone arrestin at 2.3 Å: evolution of receptor specificity. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354*: 1069-1080.
- Campbell, I.D., Spitzfaden, C. Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure* **1994**, *2*: 333-337.
- Dell'Angelica, E.C. Clathrin-binding proteins: got a motif? Join the network! *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*: 315-318.
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Jr., Keen, J.H., Benovic, J.L. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*: 15011-15006.
- Burtey, A., Schmid, E.M., Ford, M.G., Rappoport, J.Z., Scott, M.G., Marullo, S., Simon, S.M., McMahon, H.T., Benmerah, A. The conserved isoleucine-valine-phenylalanine motif couples activation state and endocytic functions of beta-arrestins. *Traffic* **2007**, *8*: 914-931.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*: 23120-23126.
- Bouschet, T., Martin, S., Kanamarlapudi, V., Mundell, S., Henley, J.M. The calcium-sensing receptor changes cell shape via a beta-arrestin-1 ARNO ARF6 ELMO protein network. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*: 2489-2497.
- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*: 42509-42513.
- Hunzicker-Dunn, M., Gurevich, V.V., Casanova, J.E., Mukherjee, S. ARF6: a newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization. *FEBS Lett.* **2002**, *521*: 3-8.
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* **2003**, *375*: 503-515.
- Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., Stamler, J.S. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. *Mol. Cell* **2008**, *31*: 395-405.
- Kiselev, A., Socolich, M., Vinos, J., Hardy, R.W., Zuker, C.S., Ranganathan, R. A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* **2000**, *28*: 139-152.
- Satoh, A.K., Ready, D.F. Arrestin1 mediates light-dependent rhodopsin endocytosis and cell survival. *Curr. Biol.* **2005**, *15*: 1722-1733.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*: 17201-17210.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*: 32248-32257.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*: 19452-19460.
- Gurevich, V.V., Benovic, J.L. Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*: 161-169.
- Vishnivetskiy, S.A., Paz, C.L., Schubert, C., Hirsch, J.A., Sigler, P.B., Gurevich, V.V. How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*: 11451-11454.
- Vishnivetskiy, S.A., Hosey, M.M., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*: 1262-1268.
- Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I.V., Lucas, S.M., Steele, R.E., Finnerty, J.R., Technau, U., Martindale, M.Q., Rokhsar, D.S. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* **2007**, *317*: 86-94.
- Nakagawa, M., Orii, H., Yoshida, N., Jojima, E., Horie, T., Yoshida, R., Haga, T., Tsuda, M. Ascidian arrestin (Ci-arr), the origin of the visual and nonvisual arrestins of vertebrate. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*: 5112-5118.
- Alvarez, C.E. On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8*: 222.
- Palczewski, K., Pulvermuller, A., Buczylo, J., Gutmann, C., Hofmann, K.P. Binding of inositol phosphates to arrestin. *FEBS Lett.* **1991**, *295*: 195-199.
- Hanson, S.M., Vishnivetskiy, S.A., Hubbell, W.L., Gurevich, V.V. Opposing effects of inositol hexakisphosphate on rod arrestin and arrestin2 self-association. *Biochemistry* **2008**, *47*: 1070-1075.
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L., Keen, J.H. Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* **1999**, *18*: 871-881.
- Hupfeld, C.J., Olefsky, J.M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*: 561-577.
- Lefkowitz, R.J., Rajagopal, K., Whalen, E.J. New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell* **2006**, *24*: 643-652.

- [39] Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J., Blobel, G.C. Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* **2003**, 301: 1394-1397.
- [40] Lin, F.T., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. beta-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273: 31640-31643.
- [41] Szabo, E.Z., Numata, M., Lukashova, V., Iannuzzi, P., Orlowski, J. beta-Arrestins bind and decrease cell-surface abundance of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE5 isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102: 2790-2795.
- [42] Wu, J.H., Peppel, K., Nelson, C.D., Lin, F.T., Kohout, T.A., Miller, W.E., Exum, S.T., Freedman, N.J. The adaptor protein beta-arrestin2 enhances endocytosis of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278: 44238-44245.
- [43] Lipsky, R., Potts, E.M., Tarzami, S.T., Puckrin, A.A., Stocks, J., Schecter, A.D., Sobie, E.A., Akar, F.G., Diverse-Pierluissi, M.A. beta-Adrenergic receptor activation induces internalization of cardiac Cav1.2 channel complexes through a beta-Arrestin 1-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283: 17221-17226.
- [44] Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J., Artavanis-Tsakonas, S. Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7: 1191-1201.
- [45] Yu, M.C., Su, L.L., Zou, L., Liu, Y., Wu, N., Kong, L., Zhuang, Z.H., Sun, L., Liu, H.P., Hu, J.H., Li, D., Strominger, J.L., Zang, J.W., Pei, G., Ge, B.X. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **2008**, 9: 898-907.
- [46] Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.G. Arrestin NK cell cytotoxicity. *Nat. Immunol.* **2008**, 9: 835-836.
- [47] Ma, L., Pei, G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J. Cell Sci.* **2007**, 120: 213-218.
- [48] Lohse, M.J., Klenk, C. Blocking them all: beta-arrestins inhibit cellular signaling. *Mol. Cell* **2008**, 31: 619-621.
- [49] Mo, W., Zhang, L., Yang, G., Zhai, J., Hu, Z., Chen, Y., Chen, X., Hui, L., Huang, R., Hu, G. Nuclear beta-arrestin1 functions as a scaffold for the dephosphorylation of STAT1 and moderates the antiviral activity of IFN-gamma. *Mol. Cell* **2008**, 31: 695-707.
- [50] Scott, M.G., Le Rouzic, E., Perianin, A., Pierotti, V., Enslen, H., Benichou, S., Marullo, S., Benmerah, A. Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277: 37693-37701.
- [51] Molla-Herman, A., Boularan, C., Ghossoub, R., Scott, M.G.H., Burtey, A., Zarka, M., Saunier, S., Concordet, J.P., Marullo, S., Benmerah, A. Targeting of beta-arrestin 2 to the centrosome and primary cilium: role in cell proliferation control. *PLOS One* **2008**, 3: e3728.
- [52] Chen, W., Ren, X.R., Nelson, C.D., Barak, L.S., Chen, J.K., Beachy, P.A., de Sauvage, F., Lefkowitz, R.J. Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* **2004**, 306: 2257-2260.
- [53] Ingham, P.W., Placzek, M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7: 841-850.
- [54] Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* **2008**, 320: 1777-1781.
- [55] Rohatgi, R., Scott, M.P. Arrestin' movement in cilia. *Science* **2008**, 320: 1726-1727.
- [56] Collins, B.M., Norwood, S.J., Kerr, M.C., Mahony, D., Seaman, M.N., Teasdale, R.D., Owen, D.J. Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* **2008**, 9: 366-379.
- [57] Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, J.S., Hurley, J.H. The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13: 540-548.
- [58] Bonifacino, J.S., Hurley, J.H. Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, 20: 1-10.
- [59] Collins, B.M. The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic* **2008**, 9: 1811-1822.
- [60] Hierro, A., Rojas, A.L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A.V., Steven, A.C., Bonifacino, J.S., Hurley, J.H. Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* **2007**, 449: 1063-1067.
- [61] Toyoda, A., Noguchi, H., Taylor, T.D., Ito, T., Pletcher, M.T., Sakaki, Y., Reeves, R.H., Hattori, M. Comparative genomic sequence analysis of the human chromosome 21 Down syndrome critical region. *Genome Res.* **2002**, 12: 1323-1332.
- [62] Hu, Y.H., Warnatz, H.J., Vanhecke, D., Wagner, F., Fiebitz, A., Thamm, S., Kahlem, P., Lehrach, H., Yaspo, M.L., Janitz, M. Cell array-based intracellular localization screening reveals novel functional features of human chromosome 21 proteins. *BMC Genomics* **2006**, 7: 155.
- [63] Pellegrini-Calace, M., Tramontano, A. Identification of a novel putative mitogen-activated kinase cascade on human chromosome 21 by computational approaches. *Bioinformatics* **2006**, 22: 775-778.
- [64] Chen, K.S., DeLuca, H.F. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1219: 26-32.
- [65] Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., Yodoi, J. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274: 21645-21650.
- [66] Yamanaka, H., Maehira, F., Oshiro, M., Asato, T., Yanagawa, Y., Takei, H., Nakashima, Y. A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 271: 796-800.
- [67] Junn, E., Han, S.H., Im, J.Y., Yang, Y., Cho, E.W., Um, H.D., Kim, D.K., Lee, K.W., Han, P.L., Rhee, S.G., Choi, I. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J. Immunol.* **2000**, 164: 6287-6295.
- [68] Schulze, P.C., De Keulenaer, G.W., Yoshioka, J., Kassik, K.A., Lee, R.T. Vitamin D3-upregulated protein-1 (VDUP-1) regulates redox-dependent vascular smooth muscle cell proliferation through interaction with thioredoxin. *Circ. Res.* **2002**, 91: 689-695.
- [69] Billiet, L., Furman, C., Larigauderie, G., Copin, C., Page, S., Fruchart, J.C., Brand, K., Rouis, M. Enhanced VDUP-1 gene expression by PPARgamma agonist induces apoptosis in human macrophage. *J. Cell Physiol.* **2008**, 214: 183-191.
- [70] Nichols, C.D., Sanders-Bush, E. Molecular genetic responses to lysergic acid diethylamide include transcriptional activation of MAP kinase phosphatase-1, C/EBP-beta and ILAD-1, a novel gene with homology to arrestins. *J. Neurochem.* **2004**, 90: 576-584.
- [71] Hyde, D.R., Mecklenburg, K.L., Pollock, J.A., Vihtelic, T.S., Benzer, S. Twenty *Drosophila* visual system cDNA clones: one is a homolog of human arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87: 1008-1012.
- [72] LeVine, H., 3rd, Smith, D.P., Whitney, M., Malicki, D.M., Dolph, P.J., Smith, G.F., Burkhart, W., Zuker, C.S. Isolation of a novel visual-system-specific arrestin: an *in vivo* substrate for light-dependent phosphorylation. *Mech. Dev.* **1990**, 33: 19-25.
- [73] Smith, D.P., Shieh, B.H., Zuker, C.S. Isolation and structure of an arrestin gene from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87: 1003-1007.
- [74] Roman, G., He, J., Davis, R.L. kurtz, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in *Drosophila*. *Genetics* **2000**, 155: 1281-1295.
- [75] Johnson, E.C., Tift, F.W., McCauley, A., Liu, L., Roman, G. Functional characterization of kurtz, a *Drosophila* non-visual arrestin, reveals conservation of GPCR desensitization mechanisms. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, 38: 1016-1022.
- [76] Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch. *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7: 1159-1161.
- [77] Verges, M. Retromer and sorting nexins in development. *Front Biosci* **2007**, 12: 3825-3851.
- [78] Belenkaya, T.Y., Wu, Y., Tang, X., Zhou, B., Cheng, L., Sharma, Y.V., Yan, D., Selva, E.M., Lin, X. The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **2008**, 14: 120-131.
- [79] Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Banziger, C., Hausmann, G., Basler, K. Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless. *Nat. Cell Biol.* **2008**, 10: 178-185.
- [80] Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., Maurice, M.M., Vincent, J.P. Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex. *Nat. Cell Biol.* **2008**, 10: 170-177.

- [81] Fukuto, H.S., Ferkey, D.M., Apicella, A.J., Lans, H., Sharmeen, T., Chen, W., Lefkowitz, R.J., Jansen, G., Schafer, W.R., Hart, A.C. G protein-coupled receptor kinase function is essential for chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **2004**, 42: 581-593.
- [82] Palmitessa, A., Hess, H.A., Bany, I.A., Kim, Y.M., Koelle, M.R., Benovic, J.L. *Caenorhabditis elegans* arrestin regulates neural G protein signaling and olfactory adaptation and recovery. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280: 24649-24662.
- [83] Coudreuse, D.Y., Roel, G., Betist, M.C., Destree, O., Korswagen, H.C. Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science* **2006**, 312: 921-924.
- [84] Prasad, B.C., Clark, S.G. Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development* **2006**, 133: 1757-1766.
- [85] Andoh, T., Hirata, Y., Kikuchi, A. PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance. *FEBS Lett.* **2002**, 525: 131-134.
- [86] Gupta, R., Kus, B., Fladd, C., Wasmuth, J., Tonikian, R., Sidhu, S., Krogan, N.J., Parkinson, J., Rotin, D. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol.* **2007**, 3: 116.
- [87] Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A., Vincent, O. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102: 12141-12146.
- [88] Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **2003**, 425: 686-691.
- [89] Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S., Snyder, M. Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* **2002**, 16: 707-719.
- [90] Nikko, E., Sullivan, J.A., Pelham, H.R. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* **2008**, 9: 1216-1221.
- [91] Shinoda, J., Kikuchi, Y. Rod1, an arrestin-related protein, is phosphorylated by Snf1-kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 364: 258-263.
- [92] Wu, A.L., Hallstrom, T.C., Moye-Rowley, W.S. ROD1, a novel gene conferring multiple resistance phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271: 2914-2920.
- [93] Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., Morgan, D.O. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **2003**, 425: 859-864.
- [94] Tevzadze, G.G., Pierce, J.V., Esposito, R.E. Genetic evidence for a SPO1-dependent signaling pathway controlling meiotic progression in yeast. *Genetics* **2007**, 175: 1213-1227.
- [95] Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelm, J., Winzler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W., Johnston, M. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **2002**, 418: 387-391.
- [96] Lin, C.H., Macgurn, J.A., Chu, T., Stefan, C.J., Emr, S.D. Arrestin-Related Ubiquitin-Ligase Adaptors Regulate Endocytosis and Protein Turnover at the Cell Surface. *Cell* **2008**, 135: 714-725.
- [97] Seaman, M.N., McCaffery, J.M., Emr, S.D. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell Biol.* **1998**, 142: 665-681.
- [98] Reddy, J.V., Seaman, M.N. Vps26p, a component of retromer, directs the interactions of Vps35p in endosome-to-Golgi retrieval. *Mol. Biol. Cell* **2001**, 12: 3242-3256.
- [99] Bachhawat, A.K., Suhan, J., Jones, E.W. The yeast homolog of Hß58, a mouse gene essential for embryogenesis, performs a role in the delivery of proteins to the vacuole. *Genes Dev.* **1994**, 8: 1379-1387.
- [100] Kama, R., Robinson, M., Gerst, J.E. Btn2, a Hook1 ortholog and potential Batten disease-related protein, mediates late endosome-Golgi protein sorting in yeast. *Mol. Cell Biol.* **2007**, 27: 605-621.
- [101] Reinders, Y., Schulz, I., Graf, R., Sickmann, A. Identification of novel centrosomal proteins in *Dictyostelium discoideum* by comparative proteomic approaches. *J. Proteome Res.* **2006**, 5: 589-598.
- [102] Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31: 3497-3500.
- [103] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36: W465-W469.
- [104] Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., Christen, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* **2006**, 7: 439.

Ce travail de thèse a été consacré à l'étude de la protéine AdcA de *Dictyostelium discoideum*. Cette protéine a été identifiée sur la base de la présence d'un domaine arrestine. Ce cœur arrestine est jouté par plusieurs domaines dont un motif FYVE et un motif répété trois fois contenant des clusters d'histidines. L'étude de la localisation subcellulaire de AdcA endogène ou de formes étiquetées couplée à l'utilisation de marqueurs de différents compartiments de la voie endocytaire ont permis de mettre en évidence un enrichissement majeur de AdcA au niveau des endosomes précoces. L'étude des différents domaines d'AdcA a mis en lumière le rôle du domaine FYVE dans sa localisation endocytaire et l'implication du domaine N-terminal riche en histidines dans son oligomérisation métal-dépendante. Mes travaux utilisant le mutant *adcA* nul indique que AdcA pourrait jouer un rôle au niveau d'une voie de recyclage entre les endosomes précoces et la membrane plasmique. Nous avons également pu montrer par des expériences de double hybride et de pull-down que AdcA est capable d'interagir avec la petite protéine G ArfA. Ceci est en accord avec un rôle de AdcA au niveau du recyclage où elle pourrait permettre en association avec ArfA un tri de protéines membranaires dans des vésicules de recyclage.

Mots-clés : *Dictyostelium*, arrestines, AdcA, voie endocytaire, recyclage, domaine FYVE

This work was dedicated to the study of the AdcA protein in *Dictyostelium discoideum*. AdcA has been identified through its arrestin domain. Its arrestin core is extended on both sides by several domains among which a FYVE domain and a triplicated histidine-rich domain. Subcellular localization studies of the endogenous protein or tagged AdcA forms coupled to the use of various endocytic markers showed that AdcA is present on early endosomes. The study of AdcA's different sub-domains has highlighted a role of the FYVE domain in this localization and a role of the histidine-rich domain in the metal-dependent oligomerization of the protein. My experimental work using an engineered *adcA* null strain suggests that AdcA could be involved in the recycling pathway going from early endosomes to the plasma membrane. By the use of the yeast two hybrid screen and pull down experiments, I have shown that AdcA is able to interact with the small G protein ArfA. This result fits with a role of AdcA on recycling vesicles where the protein could, in association with ArfA, sort membrane proteins for recycling.

Key-words : *Dictyostelium*, arrestins, AdcA, endocytic pathway, recycling, FYVE domain